



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Expressão Circadiana de Citocromos P450 envolvidos no Metabolismo de Xenobióticos no Plexo Coróide**

**Andreia Filipa Trindade Domingos**

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

Orientadora: Prof. Doutora Telma Quintela  
Coorientadora: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

**Covilhã, outubro de 2014**



O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora

---

(Andreia Filipa Trindade Domingos)



# Agradecimentos

Queria agradecer a todos aqueles que contribuíram com o seu apoio, compreensão e incentivo para a realização desta dissertação de mestrado. Em especial, não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas:

Aos meus queridos pais, avós e irmão, que sempre me acarinharam e apoiaram nas escolhas que fiz na vida. A eles devo tudo o que sou.

À Professora Doutora Telma Quintela, por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, mesmo nos meus dias menos bons. Agradeço toda a disponibilidade, orientação científica e conhecimentos teóricos e práticos transmitidos.

À Professora Doutora Isabel Gonçalves, pela orientação científica, pelo apoio, incentivo e conhecimentos transmitidos, durante a realização da dissertação.

À Professora Doutora Cecília Santos pela possibilidade que me deu em participar neste projeto e pela disponibilidade prestada.

À Professora Doutora Helena Marcelino, Joana Tomás e aos restantes colegas de laboratório pela ajuda e disponibilidade no decorrer deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer à Tânia Albuquerque por toda amizade, paciência e companheirismo durante este percurso. Juntas vivemos grandes momentos dentro e fora do laboratório. Um obrigada à Daniela Talhada pela amizade e ajuda prestada nos momentos finais da realização deste trabalho.

A todos os meus amigos do Algarve e da Covilhã, por todo o carinho e compreensão que sempre demonstraram.

A todos o meu Muito Obrigada.



## Resumo

O Plexo coróide (CP) está envolvido em vários processos que monitorizam e mantêm a homeostase bioquímica e celular do sistema nervoso central. Esta estrutura participa em processos de desintoxicação através da regulação dos mecanismos de transporte, da síntese e da secreção de compostos ativos, que são nocivos para o cérebro.

O CP expressa proteínas de transporte e de metabolização de fármacos, que regulam a entrega destes ao líquido cefalorraquidiano (CSF) e que participam na sua biodisponibilidade. As enzimas metabolizadoras de fármacos, nomeadamente os citocromos P450 (CYP), foram detetadas no cérebro de diversas espécies, demonstrando uma distribuição heterogénea com níveis de expressão variáveis entre as diferentes regiões do cérebro.

Apesar dos níveis de expressão das enzimas de desintoxicação serem considerados de expressão constitutiva, estudos de *microarrays* em moscas e mamíferos sugeriram uma expressão circadiana de vários genes de metabolização de xenobióticos. A expressão circadiana dos genes de enzimas metabolizadoras de xenobióticos pode ter implicações na toxicologia humana, os efeitos da exposição a produtos químicos, em diferentes momentos do dia. Com base nestes dados, o objetivo do presente trabalho foi verificar se os genes CYP estariam presentes no CP e se a sua expressão seria circadiana em CP de ratos fêmea e macho.

Verificamos que o CYP1B1 apresenta uma expressão circadiana no CP de ratos fêmea. Sob condições de disrupção circadiana, escuridão ou luz constante, observou-se que a expressão de CYP1B1 aumentou nas fêmeas submetidas a luminosidade constante. Além disso, a administração de estradiol (E<sub>2</sub>) e benzo(a)pireno (BaP) mostrou um aumento da expressão de CYP1B1 nas células epiteliais de CP de rato.

Em suma, o ritmo circadiano parece influenciar a expressão de CYP no CP de rato, contribuindo para estudos posteriores com o objetivo de perceber de que forma os ritmos biológicos podem interferir com a cinética de fármacos no cérebro.

## Palavras-chave

Metabolismo dos xenobióticos, ritmo circadiano, plexo coróide, citocromo p450.



# Abstract

Choroid plexus (CP) is involved in a variety of processes that monitor and maintain the biochemical and cellular homeostasis of the central nervous system. This structure participates in detoxification processes by regulating transport mechanisms, synthesis and secretion of active compounds that are noxious to brain.

CP specifically expresses drug-metabolizing enzymes and transport proteins, which regulate cerebrospinal fluid (CSF) drug delivery, and participate in drug biodisposition. Drug-metabolizing enzymes cytochromes P450 (CYP) have been detected in the brains of multiple species, demonstrating a heterogeneous distribution with expression levels varying among different brain regions.

Besides expression levels of detoxifying enzymes are considered of constitutive expression, microarray studies in flies and mammals have suggested a daily rhythmicity of that several xenobiotic metabolizing genes. The circadian expression of xenobiotic metabolizing genes may have implications for human toxicology, such as the effects of chemical exposures at different times of day. Based on these data we questioned if CYP genes are present in the CP, as well as the circadian expression in female and male rat CP.

We found that CYP1B1 shows a circadian expression in the CP of female rats. Under disrupted circadian conditions, constant light or darkness, we observed that CYP1B1 expression increased in females under constant lightness. Furthermore, the administration of estradiol (E<sub>2</sub>) and benzo(a)pyrene (BaP) shown an increase of CYP1B1 expression in rat CP epithelial cells.

Circadian rhythm seems to influence CYP expression in rat CP, contributing to understand how biological rhythms might interfere with drug kinetics in brain.

## Keywords

Xenobiotic metabolism, circadian rhythm, choroid plexus, cytochrome p450.



# Índice

<b>I. Introdução</b> .....	1
1. Plexo Coróide .....	1
1.1. Estrutura e Morfologia .....	1
1.2. Fisiologia.....	3
1.2.1. Produção e secreção de líquido cefalorraquidiano.....	3
1.2.2. Produção de proteínas .....	4
1.2.3. Função imunológica.....	5
1.2.4. Proteção toxicológica .....	6
2. Metabolismo dos Xenobióticos.....	7
2.1. Citocromo P450 .....	9
2.1.1. Características gerais .....	9
2.1.2. Estrutura básica.....	11
2.1.3. Mecanismo geral de catálise.....	11
2.1.4. Nomenclatura .....	12
2.1.5. Famílias CYP envolvidas no Metabolismo de Xenobióticos .....	13
2.2. Metabolismo dos xenobióticos no cérebro .....	15
3. Ritmo Circadiano .....	17
3.1. Oscilador circadiano central .....	17
3.1.1. Aferências e Eferências do SCN .....	18
3.2. Osciladores Circadianos .....	19
3.3. Mecanismo Molecular do Ritmo Circadiano .....	20
3.4. Ritmo circadiano e Metabolismo dos xenobióticos.....	21
3.5. Disrupção do ritmo circadiano .....	23
<b>II. Objetivo</b> .....	25
<b>III. Metodologia</b> .....	27
1. Animais .....	27
1.1. Recolha dos plexos coróides de ratos a diferentes <i>zeitgebers</i> .....	27
1.2. Recolha dos plexos coróides de ratos após disrupção do ritmo circadiano .....	27
2. Cultura primária de células epiteliais do plexo coroide de rato .....	28
2.1. Estímulos com Estradiol e Benzo(a)pireno .....	28
3. RNA total .....	29
3.1. Extração de RNA total de plexo coróide.....	29

3.2.	Determinação da integridade do RNA total .....	30
3.3.	Quantificação do RNA total .....	30
4.	Síntese de DNA Complementar .....	30
5.	RT-PCR .....	31
6.	PCR em Tempo Real .....	32
7.	Imunohistoquímica por fluorescência em Whole-Mount .....	33
8.	Imunocitoquímica por fluorescência .....	33
9.	Western Blot .....	34
10.	Análise Estatística .....	35
<b>IV.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
1.	Presença de enzimas do metabolismo dos xenobióticos no plexo coróide de rato.....	37
1.1.	Análise da expressão dos genes CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 .....	37
1.2.	Análise da expressão das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 .....	38
1.3.	Localização das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 no plexo coróide de rato ...	39
1.4.	Localização das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em células epiteliais de plexo coróide de rato .....	40
2.	Expressão circadiana da enzima CYP1B1 no plexo coróide de rato .....	41
2.1.	Análise da oscilação circadiana de CYP1B1 .....	41
2.2.	Análise da disrupção circadiana na expressão da enzima CYP1B1 .....	43
3.	Regulação dos níveis de CYP1B1 em células epiteliais de plexo coróide de rato .....	44
3.1.	Efeito do estradiol na expressão do gene CYP1B1 .....	44
3.2.	Efeito do Benzo(a)pireno na expressão do gene CYP1B1 .....	45
<b>V.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>47</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>51</b>
<b>VII.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Localização dos plexos coróides no sistema nervoso central. ....	2
<b>Figura 2.</b> Morfologia das células epiteliais do plexo coróide. ....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema das três fases do metabolismo dos xenobióticos. ....	8
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de regulação da expressão do citocromo P450 e de outras enzimas metabolizadoras de xenobióticos. ....	9
<b>Figura 5.</b> Localização do citocromo P450 na célula. ....	10
<b>Figura 6.</b> Ciclo catalítico do citocromo P450. ....	12
<b>Figura 7.</b> Componentes do sistema circadiano dos mamíferos. ....	19
<b>Figura 8.</b> Mecanismo molecular do ritmo circadiano nos mamíferos. ....	22
<b>Figura 9.</b> Eletroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos de RT-PCR para estudo da expressão de mRNA das enzimas do metabolismo dos xenobióticos no plexo coróide de rato. 37	
<b>Figura 10.</b> Western blot realizados a partir de extratos de proteína total de plexo coróide de rato. ....	38
<b>Figura 11.</b> Imunofluorescência das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em explantes de plexo coróide de rato. ....	39
<b>Figura 12.</b> Imunofluorescência das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato. ....	41
<b>Figura 13.</b> Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 ao longo do dia, no plexo coróide de rato. ....	42
<b>Figura 14.</b> Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 após interrupção circadiana, no plexo coróide de rato. ....	44
<b>Figura 15.</b> Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato, após estímulo com diferentes concentrações de estradiol (0 nM, 10 nM, 100 nM e 500 nM) durante 24 horas. ....	45
<b>Figura 16.</b> Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato, após estímulo com diferentes concentrações de benzo(a)pireno (0 µM, 1 µM e 5 µM) durante 6 horas. ....	46



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Funções das famílias citocromo P450 .....	13
<b>Tabela 2.</b> Funções, locais de expressão e substratos dos genes CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9. ....	15
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> dos genes da via do metabolismo de xenobióticos. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Condições utilizadas na amplificação dos genes da via do metabolismo de xenobióticos.....	32



## Lista de Acrónimos

AhR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
BaP	Benzo(a)pireno
BMAL1	<i>Brain and muscle-Arnt-like 1</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
cDNA	DNA Complementar
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CNS	Sistema nervoso central
CP	Plexo coróide
CPEC	Células epiteliais de plexo coróide
Cry1-2	Criptocromo 1-2
CSF	Líquido cefalorraquidiano
CYP	Citocromo P450
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe
E <sub>2</sub>	Estradiol
EE	Escuridão Constante
EPH	Epóxido Hidrolase
ER	Recetor de Estrogénio
FBS	Soro fetal bovino
GHT	Trato geniculohipotalâmico
GST	Glutathione S-Transferase
IGF-II	Fator de Crescimento semelhante à Insulina II
L/E	Luz/Escuridão
LL	Luz Constante
MRN	Núcleo da Rafe Mediano
mRNA	RNA Mensageiro
MRP	Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos
OAT	Transportadores de Aniões Orgânicos
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PARbZip	<i>PAR-domain basic leucine zipper</i>
pB	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-T	Tampão Fosfato Salino - Tween
Per1-2	Período 1-2
PFA	Paraformaldeído
P-gp	P-Glicoproteínas
PNS	Sistema Nervoso Periférico
PST	Fenol Sulfotransferase
PXR	Pregnane X Receptor
Rev-Erb	Recetor nuclear
RHT	Trato Retinohipotalâmico
RNAses	Ribonucleases

ROR $\alpha$	Recetor Órfão relacionado ao Ácido Retinóico Alfa
RNA <sub>t</sub>	RNA Total
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa
SCN	Núcleo supraquiasmático
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante $\beta$
TJ	<i>Tight Junctions</i>
TTR	Transtirretina
UGT	UDP-Glucuronotransferase
ZT	<i>Zeitgeber</i>

# I. Introdução

## 1. Plexo Coróide

### 1.1. Estrutura e Morfologia

O Plexo Coróide (CP) é uma estrutura cerebral intra-ventricular, ramificada e altamente vascularizada, que forma uma interface única entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano (CSF) (Serot *et al.*, 2012; Quintela *et al.*, 2013). O CP origina-se a partir de pregas da pia-máter altamente vascularizadas e revestidas por uma camada de células epiteliais, denominadas *tela coroidea* (Choudhuri *et al.*, 2003; Mortazavi *et al.*, 2014).

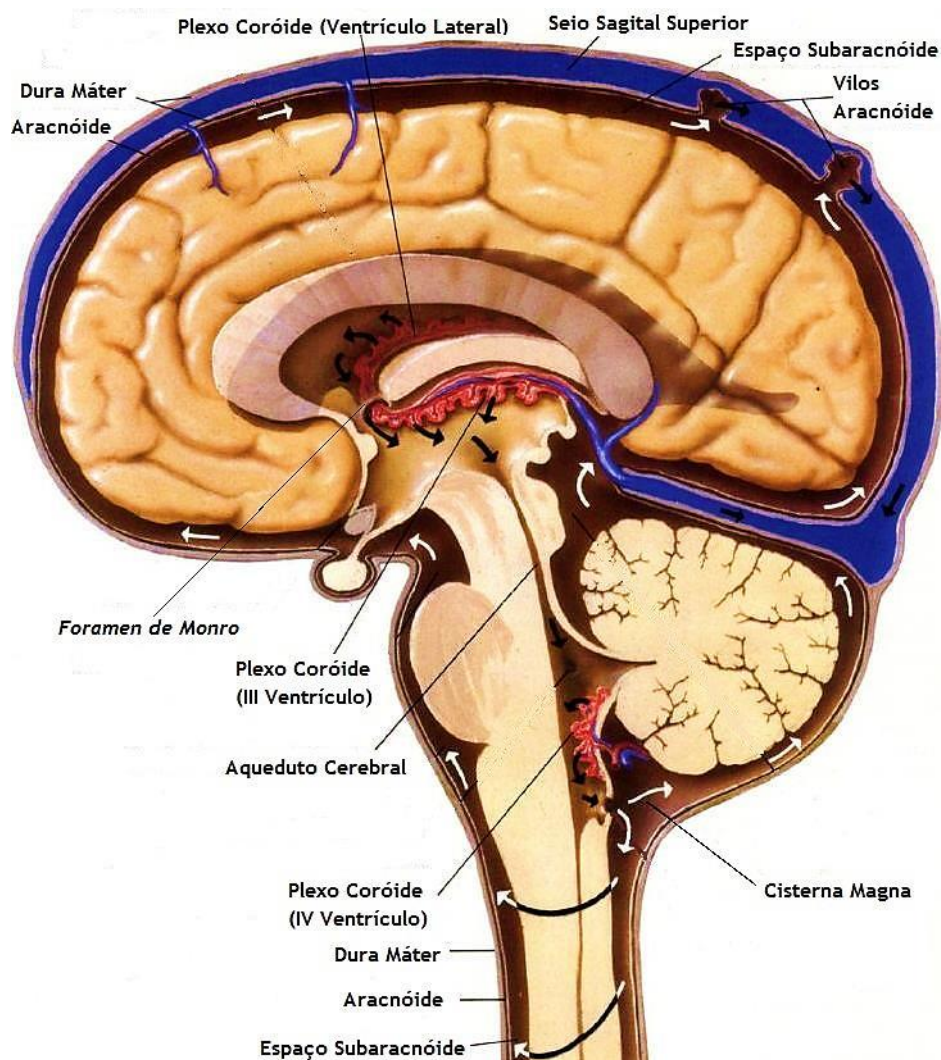
Existe um CP em cada um dos quatro ventrículos do cérebro, localizados nos ventrículos laterais, no topo do III ventrículo e no IV ventrículo (Figura 1) (Wolburg e Paulus, 2010). Os dois ventrículos laterais comunicam através do *foramen* intraventricular (*foramen de Monro*) com o III ventrículo, que por sua vez, está conectado com o IV ventrículo pelo aqueduto cerebral (aqueduto de *Sylvius*). O IV ventrículo é contínuo com o canal central da medula espinhal, e com o espaço subaracnoide através das *foramina* (Snell, 2010).

Os plexos coróides (CPs) dos ventrículos laterais têm uma estrutura semelhante a folhas finas rendilhadas, projetando-se a partir da superfície interior do ventrículo. O CP do IV ventrículo tem uma estrutura altamente lobulada e complexa, situada na parte ventral e caudal do cerebelo. Por fim, o CP do III ventrículo apresenta uma estrutura intermédia entre os plexos laterais e o CP do IV ventrículo (Wolburg *et al.*, 2010).

Morfologicamente, o epitélio que reveste os CPs é constituído por uma monocamada contínua de células cuboides com vilosidades e originado a partir do revestimento endimário ventricular (Figura 2) (Choudhuri *et al.*, 2003; Serot *et al.*, 2012). Estas células são geralmente consideradas como células endimárias modificadas com características epiteliais, sendo referidas como células epiteliais do plexo coróide (CPEC) (Emerich *et al.*, 2004).

As células epiteliais estão ligadas entre si por *tight junctions* (TJs), criando uma barreira que restringe a passagem de substâncias entre o sangue e o CSF. A membrana apical (ventricular) das CPEC contém inúmeras vilosidades e cílios, enquanto a membrana basal possui um aspeto liso com muitas invaginações, estando localizada sob a lâmina basal. Por sua vez, a lâmina basal está sob o estroma de tecido conjuntivo, onde se encontram células dendríticas, fibroblastos e macrófagos, bem como capilares fenestrados que irrigam o CP (Emerich *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2013). Estas particularidades das CPEC proporcionam assim uma extensa

área de contato entre o epitélio e o CSF, bem como entre o epitélio e o fluido intersticial do CP (Praetorius, 2007).

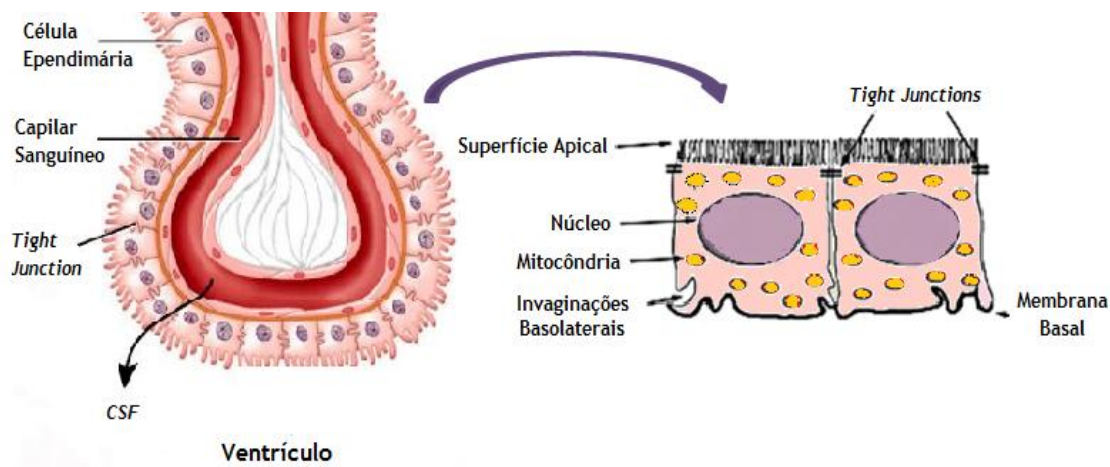


**Figura 1. Localização dos plexos coróides no sistema nervoso central.**

Cada hemisfério cerebral possui um ventrículo lateral que comunica com o III ventrículo através do *foramen* intraventricular, que por sua vez comunica com o IV ventrículo através do aqueduto cerebral. No interior de cada ventrículo localiza-se um plexo coróide (adaptado de <http://clinicclinic2.cafe24.com/clncl-mdcne/nrsrgry/Dx/CSF%20circulation.htm>).

Estruturalmente, as células epiteliais apresentam um grande núcleo esférico central, citoplasma com numerosas mitocôndrias, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomas. As mitocôndrias são observadas em grande abundância na zona apical do citoplasma, onde são necessárias para o transporte ativo de íons através da membrana apical, que requer altas taxas de síntese de adenosina trifosfato. É esta capacidade de síntese que

permite a produção e secreção de CSF, entre outras funções do CP (Praetorius, 2007; Marques *et al.*, 2013).



**Figura 2. Morfologia das células epiteliais do plexo coróide.**

As células epiteliais têm um lado apical bem desenvolvido e invaginações no lado basolateral, bem como numerosas mitocôndrias. Esta característica confere às células um importante papel no transporte de fluidos e solutos. Os capilares que fornecem o plexo coróide são fenestrados, aumentando assim o movimento de fluidos e solutos através do endotélio (adaptado de Smith *et al.*, 2004; <http://www.studyblue.com/notes/note/n/md-1-study-guide-2012-13-doolittle/deck/9712210>).

## 1.2. Fisiologia

A nível fisiológico, o CP é uma estrutura multifacetada, conferindo um largo espectro de ações no cérebro. Uma das principais funções do CP é a produção e secreção de CSF para os ventrículos (Serot *et al.*, 2012). Além disso, o CP detém funções homeostáticas que estabilizam o ambiente intersticial dos neurónios, através da produção de uma ampla gama de peptídeos, citocinas, hormonas, fatores de crescimento, neurotransmissores e seus respetivos recetores (Johanson *et al.*, 2005; Quintela *et al.*, 2013). Também têm sido atribuídas ao CP funções semelhantes às efetuadas pelos rins, fígado e sistema imunitário. Estas evidências demonstram que este tecido poderá ter uma enorme relevância a nível da patologia e terapêutica do sistema nervoso central (CNS) (Johanson *et al.*, 2005).

### 1.2.1. Produção e secreção de líquido cefalorraquidiano

O CP produz e secreta CSF para o lúmen ventricular (Choudhuri *et al.* 2003). A principal função do CSF é criar um ambiente adequado para o cérebro e a medula espinhal, neutralizando assim eventuais impactos nocivos. Outro aspeto relevante do CSF é o facto de permitir o transporte de metabolitos, toxinas e nutrientes a todo o CNS (Brodbeck e Stoodley,

2007). Este líquido regula não só a homeostasia do CNS, mas também participa na renovação de células estaminais neurais, na neuroproteção, nos ciclos de sono/vigília e em vários distúrbios neurológicos (Quintela *et al.*, 2013).

O CSF compreende a maior fração do fluido extracelular do CNS, tendo cerca de  $\frac{2}{3}$  da sua produção gerada pelos CPs e os restantes 10-30% provêm do fluxo de fluidos intersticiais (Smith *et al.*, 2004; Skipor e Thiery, 2008). O processo de produção e secreção de CSF pelo CP engloba duas etapas. A primeira etapa envolve a filtração passiva do plasma, partindo dos capilares para a superfície basolateral das células epiteliais. Durante a segunda etapa há a secreção ativa do CSF através da monocamada epitelial a partir da membrana apical para a cavidade ventricular (Chikly e Quaghebeur, 2013).

Apesar de ser um líquido praticamente incolor, o CSF não é um simples ultrafiltrado do plasma. Noventa e nove por cento do CSF é por água, apresentando elevadas concentrações de cloreto, magnésio e sódio; e baixas concentrações de glucose, proteínas, aminoácidos e alguns iões. Comparativamente ao plasma, o CSF apresenta um pH relativamente mais baixo (Skipor *et al.*, 2008; Serot *et al.*, 2012).

Por influenciar a composição do CSF, o CP desempenha um papel relevante na regulação da homeostasia cerebral. A capacidade de transporte de moléculas não só protege o cérebro de potenciais insultos toxicológicos, mas também é importante na regulação da distribuição de vários compostos fisiologicamente e farmacologicamente importantes entre o sangue e o CSF (Choudhuri *et al.*, 2003).

### 1.2.2. Produção de proteínas

Para além da produção de CSF, o CP também sintetiza e secreta uma série de proteínas e polipéptidos (Redzic e Segal, 2004). Esta secreção proteica permite ao CP estabelecer e manter o meio extracelular adequado em todo o CNS, distribuindo estas moléculas a partir dos ventrículos para células do cérebro e medula espinhal (Emerich *et al.*, 2004). Os polipéptidos secretados podem exercer efeitos autócrinos e/ou parácrinos, ou atuar em células-alvo mais distantes no tecido cerebral (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001; Redzic *et al.*, 2004).

As CPEC sintetizam numerosas proteínas como a transtirretina (TTR), o fator de crescimento transformante B (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e a vasopressina (VP) (Emerich *et al.*, 2004). Entre as proteínas mais abundantes no CSF encontra-se a TTR, que participa no transporte de hormonas tiróideas no parênquima cerebral (Chodobski *et al.*, 2001; Serot *et al.*, 2012; Spector e Johanson, 2013).

A VP encontra-se principalmente acumulada próximo da membrana apical das CPEC e é regulada por hormonas e péptidos, que aumentam a secreção de VP em resposta a estímulos fisiológicos, como a desidratação (Chodobski *et al.*, 2001; Redzic *et al.*, 2004).

A presença do IGF-II também foi confirmada no CP, bem como na microvasculatura cerebral e meninges (Chodobski *et al.*, 2001; Redzic *et al.*, 2004). O IGF-II desempenha um papel importante na reparação do CP e de outras zonas do cérebro, após isquémia ou lesão cerebral (Redzic *et al.*, 2005).

As isoformas TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 são expressas constitutivamente no epitélio coróide. Em resposta a lesões isquémicas, grandes quantidades de TGF- $\beta$  são segregadas do epitélio coróide para o CSF. Posteriormente, o TGF- $\beta$  passa por difusão para o parênquima cerebral, onde desempenha um papel importante na sobrevivência e recuperação neuronal (Chodobski *et al.*, 2001; Redzic *et al.*, 2005).

### 1.2.3. Função imunológica

O CNS tem sido considerado um local imunologicamente privilegiado, sem necessidade inerente para imunovigilância (Emerich *et al.*, 2005). O termo "imunologicamente privilegiado" descreve a proteção quase total do cérebro contra agentes invasores ou xenobióticos através de barreiras físicas, tal como a barreira hemato-encefálica (Emerich *et al.*, 2005; Meyer e Gehlhaus, 2010). A primeira indicação de interações e/ou sinalizações mediadas pelo CP entre o sistema imunitário periférico e o cérebro derivou de demonstrações que comprovaram que o CP continha células linfóides induzíveis (Emerich *et al.*, 2005).

Em resposta à inflamação há um reforço da imunovigilância pelo CSF e pelas células apresentadoras de antigénio no CP, o que sugere que respostas imunitárias inatas e adaptativas também são importantes para a manutenção, reparação e renovação no CNS (Johanson *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2010). A sinalização entre o sistema imunitário e o cérebro ocorre quando moléculas imunitárias interagem com recetores constitutivos expressos no CP, como o CD14 e TLR4, TLR7 e TLR9, iniciando assim uma cascata de citocinas e transmissão de sinal para o CNS (Johanson *et al.*, 2005; Dragunow, 2013).

As CPEC expressam também moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade classe I e II na sua superfície, apresentando antigénios e estimulando a proliferação de linfócitos T para o CNS, quer em condições normais, quer em condições patológicas como doenças neurodegenerativas (Emerich *et al.*, 2005; Johanson *et al.*, 2005; Dragunow, 2013). Assim, o CP tem um papel importante na resposta a moduladores imunitários, na secreção de agentes imunologicamente ativos e na regulação da entrada de células imunitárias (macrófagos, células dendríticas, células T, neutrófilos, etc) no CNS (Dragunow, 2013).

#### 1.2.4. Proteção toxicológica

O sistema ventricular é a primeira linha de defesa do cérebro, através do seu sistema único de desintoxicação. O CP protege o cérebro de compostos nocivos, desempenhando um papel importante na regulação da troca de metais pesados, péptidos e pequenas moléculas, entre o sangue e o CSF (Choudhuri *et al.*, 2003; Mortazavi *et al.*, 2014).

Um conjunto de enzimas metabolizadoras de xenobióticos encontram-se expressas no CP, como as enzimas de fase I-III para funcionalização, conjugação e transporte de fármacos (Emerich *et al.*, 2005). O epitélio coróide expressa ainda um grande número de proteínas envolvidas no transporte de compostos lipofílicos, como proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (MRPs), P-glicoproteínas (P-gps) e transportadores de aniões orgânicos (OATs) 3, localizados na membrana apical das células epiteliais (Redzic *et al.*, 2005).

O CP possui também altas concentrações de glutathiona, cisteína e metalotioneína, moléculas que sequestram agentes tóxicos que circulam no CSF. Além disso, a presença das enzimas superóxido dismutase, glutathiona-S-transferase (GST), glutathiona peroxidase e redutase no CP, permite a proteção do cérebro contra o *stress* oxidativo provocado por radicais livres. Estas evidências, sem dúvida definem o CP como uma das estruturas mais importantes do CNS, onde várias proteínas e enzimas envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e/ou proteção contra *stress* oxidativo estão expressas (Choudhuri *et al.*, 2003; Emerich *et al.*, 2005; Mortazavi *et al.*, 2014).

## 2. Metabolismo dos Xenobióticos

O termo “xenobiótico” é utilizado para descrever compostos químicos exógenos ao organismo, incluindo não apenas fármacos, mas também constituintes de plantas, pesticidas, cosméticos, especiarias, fragâncias, aditivos alimentares, químicos industriais e poluentes ambientais. Estas substâncias químicas são assimiladas por via aérea, por ingestão de alimentos e água ou por administração de fármacos (Patterson *et al.*, 2010). A exposição humana a xenobióticos é difusa, estimando-se que o Homem possa estar exposto entre 1 a 3 milhões de xenobióticos, durante toda a sua vida (Patterson *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012).

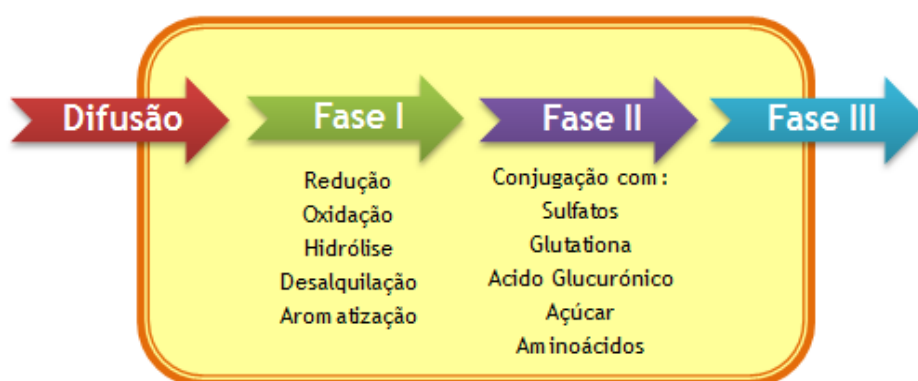
Muitos xenobióticos tais como fármacos, toxinas e poluentes passam por um processo metabólico que reduz a sua atividade tóxica ou farmacológica, aumentando assim a sua solubilidade em água e permitindo a sua subsequente eliminação (Gherzi-Egea e Strazielle, 2001). O fígado é reconhecido como o principal local de biotransformação, mas tecidos extra-hepáticos como o rim, pulmão, intestino, pele e cérebro, também contribuem para o metabolismo de fármacos (Gherzi-Egea *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2011).

O metabolismo dos xenobióticos é um processo durante o qual moléculas polares sofrem processos de desintoxicação endógena, tais como reações enzimáticas de funcionalização e/ou conjugação, que modificam as suas propriedades farmacológicas tornando-as menos tóxicas, mais polares e assim mais facilmente excretadas através da urina, bÍlis ou fezes. Por outro lado, a modificação das propriedades farmacológicas de compostos pode ainda ativar químicos inertes transformando-os em espécies biologicamente ativas (Patterson *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012). Assim, as modificações efetuadas pelas enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem determinar o destino metabólico de um químico, a sua toxicidade ou capacidade de transformação celular (Gonzalez, 2003).

A biotransformação de xenobióticos ocorre através de um processo multifásico (Figura 3) assegurado por três grupos de proteínas com funções distintas e sucessivas (Bauer *et al.* 2011). Os processos envolvidos na biotransformação são classificados em reações de funcionalização (fase I) e conjugação (fase II), seguidas da excreção do metabolito (fase III):

- Reações de fase I - correspondem à ativação/inibição de químicos pela adição ou exposição de grupos funcionais. Entre as reações das enzimas de fase I encontram-se a monooxigenação, desalquilação, redução, aromatização ou hidrólise. No cérebro foram identificadas algumas enzimas de fase I como a monoamina oxidase, a citocromo P450 (CYP), a NADPH-CYP450 redutase e a epóxido hidroxilase (EPH) (Matsuo *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2011; Gachon e Firsov, 2011);

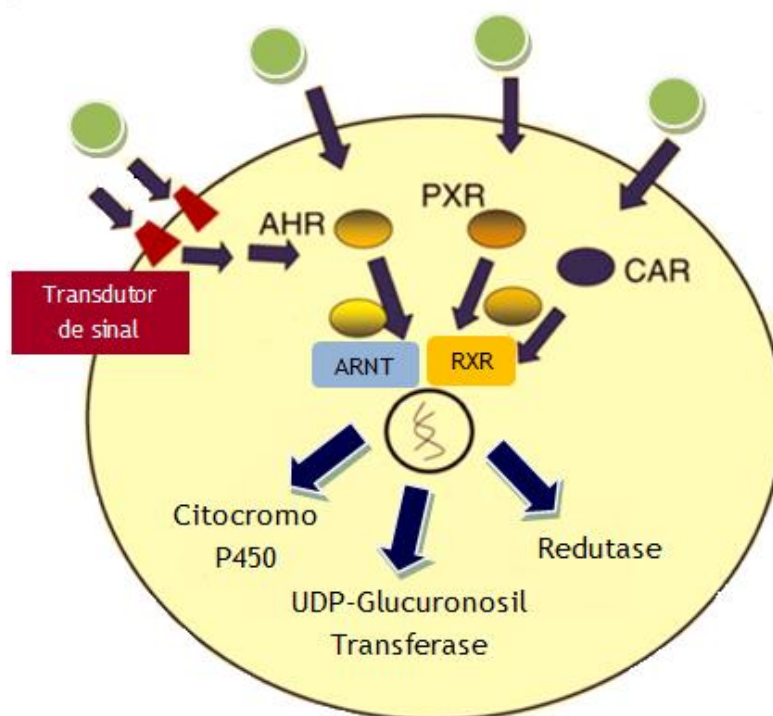
- Reações de fase II - correspondem à conjugação dos grupos funcionais das moléculas modificadas com um grupo polar, como um aminoácido, um sulfato, uma glutatona ou um açúcar. De entre as enzimas pertencentes a esta fase, as fenol sulfotransferases (PST), as UDP-glucuronotransferases (UGT) e as glutatona S-transferases (GSTs) foram identificadas no cérebro (Bauer *et al.*, 2011; Gachon *et al.*, 2011);
- Reações de fase III - correspondem à excreção de compostos hidrofílicos através de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), como as MRPs ou P-gps (Gachon *et al.*, 2011).



**Figura 3. Esquema das três fases do metabolismo dos xenobióticos.**

O processo envolvido na biotransformação dos fármacos é classificado em fase I, onde há a funcionalização do composto, seguido da fase II onde há a conjugação do composto com outras moléculas, finalizando na fase III, onde há a excreção do metabolito para fora da célula (adaptado de Bauer *et al.*, 2011).

A expressão destas enzimas metabolizadoras e transportadores é principalmente regulada por um sistema de recetores nucleares ativados por ligandos xenobióticos ou metabolitos fisiológicos. Estes recetores são expressos principalmente no fígado e no intestino delgado, encontrando-se situados no citoplasma associados com chaperonas. Em resposta a sinais de ligação ou de ativação de xenobióticos, estes recetores acumulam-se no núcleo onde ativam a transcrição de genes de fase I, II e III. Entre os recetores nucleares, os mais importantes são o *Constitutive Androstane Receptor* (CAR) e o *Pregnane X Receptor* (PXR) (Gachon *et al.*, 2011; Kurzawski *et al.*, 2012). Além disso, o fator de transcrição citosólico *Aryl hydrocarbon Receptor* (AhR) também ativa muitas enzimas de desintoxicação de fase I (ex: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) e fase II (ex: UGT1A1, UGT1A6, GSTA1), bem como transportadores ABC (Figura 4) (Kurzawski *et al.*, 2012).



**Figura 4. Mecanismos de regulação da expressão do citocromo P450 e outras enzimas metabolizadoras de xenobióticos.**

A transcrição das enzimas citocromo P450 é regulada por três receptores citosólicos, o *Pregnane X Receptor* (PXR), o *Constitutive Androstane Receptor* (CAR) e o *Aryl hydrocarbon Receptor* (AhR), que detetam a presença de xenobióticos. Em alguns casos, receptores extracelulares podem ativar alguns desses receptores por vias de transdução de sinal (adaptado de Ingelman-Sundberg, 2004).

Os citocromos P450 (CYPs) são considerados a classe de enzimas de fase I metabolizadoras de xenobióticos (Gonzalez, 2003). Foram identificados ortólogos de enzimas CYP, entre o rato e o Homem com funções semelhantes, mas com diferenças na sua atividade (Johnson *et al.*, 2012). Devido a estas diferenças, conclui-se que é importante compreender os aspetos qualitativos e quantitativos do metabolismo de xenobióticos em seres humanos e em outras espécies, para entender melhor os aspetos mecanísticos dos perfis de toxicidade (Patterson *et al.*, 2010).

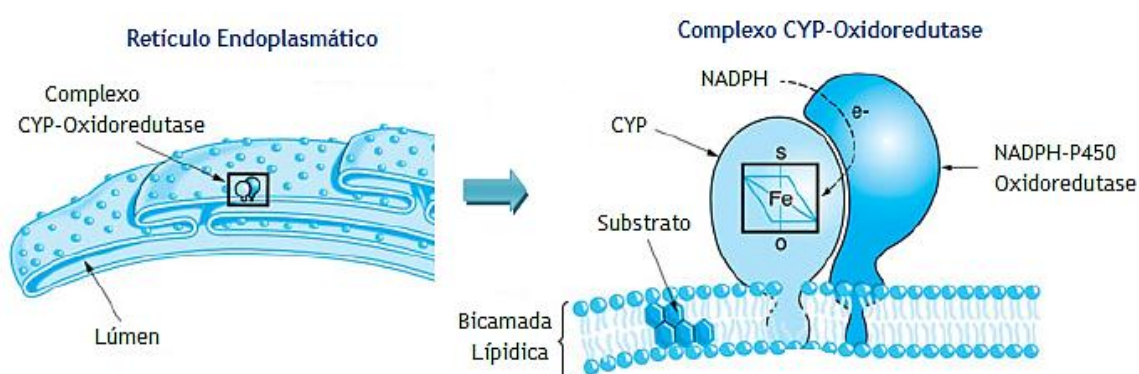
## 2.1. Citocromo P450

### 2.1.1. Características gerais

Entre animais e plantas, o principal responsável pelo metabolismo oxidativo de uma ampla variedade de compostos exógenos e endógenos, corresponde ao sistema CYP (Miksys e Tyndale, 2013). Os CYPs são uma superfamília de hemoproteínas responsáveis por

transformações metabólicas oxidativas, peroxidativas e redutoras de xenobióticos (Wauthier *et al.*, 2007).

O fígado é o órgão onde existe a maior quantidade de enzimas CYP num organismo. No entanto, os CYPs também se encontram expressos em outros locais como o trato gastrointestinal, e em pequenas proporções nos pulmões, nos rins e no CNS (Neve e Ingelman-Sundberg, 2008). Nos mamíferos, os CYPs são os componentes terminais de um sistema de transferência de elétrons presente na membrana do retículo endoplasmático (Figura 5) (Gibson e Skett, 2001; Guengerich, 2003). Apesar de serem considerados microsossomais, algumas frações de P450 também estão localizados nas mitocôndrias (Guengerich, 2003).



**Figura 5. Localização do citocromo P450 na célula.**

A maioria das enzimas citocromo P450 (CYP) está localizada na bicamada fosfolipídica na superfície do retículo endoplasmático. A enzima NADPH-citocromo P450 oxidoreductase, também presente no retículo, transfere elétrons para o CYP que, na presença de oxigênio, pode oxidar substratos xenobióticos. Cada enzima CYP contém um grupo prostético Fe<sup>3+</sup>/ protoporfirina IX que funciona para ligação e ativação do oxigênio (adaptado de Brunton *et al.*, 2008).

O mecanismo dos CYPs é uma cascata complexa de passos sucessivos envolvendo a interação com proteínas redox e o consumo de equivalentes redutores, na forma de NADPH (Denisov *et al.*, 2005). Os CYPs podem ser divididos em quatro classes dependendo de como os elétrons do NADPH são transferidos para o local catalítico. As proteínas de classe I requerem uma redutase contendo FAD e uma ferredoxina; as proteínas de classe II requerem apenas uma redutase contendo FAD/FMN para transferência de elétrons; as proteínas de classe III são auto-suficientes e não requerem doadores de elétrons, enquanto que os CYPs da classe IV recebem elétrons diretamente a partir do NADPH (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000).

### 2.1.2. Estrutura básica

Os CYPs são classificados como proteínas hemo-cisteinato, com um  $\text{Fe}^{3+}$ / protoporfirina IX como grupo prostético. Este grupo prostético é comum a outras hemoproteínas, como a hemoglobina e a mioglobina, no entanto apresenta funções biológicas diferentes (Gibson *et al.*, 2001; Bruno e Njar, 2007).

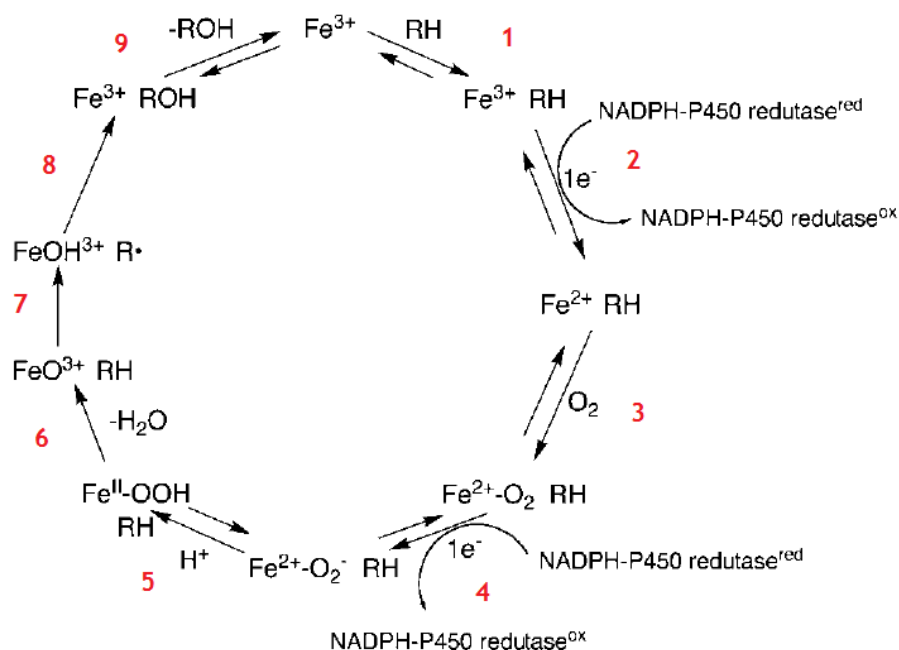
O hemo do CYP está ligado não-covalentemente à apoproteína, por essa razão o nome “citocromo P450” deriva do citocromo (ou pigmento) exibir uma absorvância espectral máxima a 450nm, quando reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$ - hemo e complexado com monóxido de carbono. A hemoproteína serve como local para a ligação/ativação de oxigénio (e local de ligação para alguns fármacos) e em conjugação com a sua flavoproteína redutase (NADPH-citocromo P450 redutase), sofre oxidação/redução cíclica do ferro hemo, que é essencial para a sua atividade catalítica (Gibson *et al.*, 2001).

### 2.1.3. Mecanismo geral de catálise

O ciclo catalítico do CYP tem como propriedade principal a capacidade do hemo-férrico sofrer reações cíclicas de oxidação/redução em conjugação com a ligação do substrato e do oxigénio (Gibson *et al.*, 2001). Os CYPs catalisam uma enorme quantidade de reações, incluindo a hidroxilação de alcanos em álcoois, a conversão de alcenos em epóxidos, sulfuretos a sulfóxidos e sulfonas, e a cisão oxidativa de ligações N-C, C-O, C-C ou C-S (Bruno *et al.*, 2007).

O mecanismo catalítico dos CYPs (Figura 6) concentra-se sobre o estado do hemo-férrico e do oxigénio, tendo como etapas mais comuns:

1. Ligação do oxigénio ao hemo-férrico reduzido e formação de um hemo oxigenado  $\text{Fe}^{2+}\text{-OO}$  ou  $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$ ;
2. Redução de um eletrão deste complexo para um estado de peróxido férrico  $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^{2-}$ , que é facilmente protonado para a forma hidroperóxido  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}^-$ ;
3. Segunda protonação do último complexo  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}^-$  no átomo de oxigénio distal para uma forma transiente instável  $\text{Fe}\text{-OOH}_2$ , que é seguida por uma cisão heterolítica da ligação O-O e libertação de uma molécula de água;
4. Várias reações dos restantes complexos metal-oxo porfirina com maior valência (Denisov *et al.*, 2005).



**Figura 6. Ciclo catalítico do citocromo P450.**

O ciclo catalítico consiste em sete etapas distintas: 1. ligação do substrato à forma férrica da enzima; 2. redução do grupo heme férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para o estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por um elétron vindo do NADPH; 3. ligação do oxigênio; 4. transferência de um segundo elétron; 5. adição de um próton; 6. quebra da ligação O-O; 7. oxigenação do substrato; 8. geração do produto; 9. liberação do produto da enzima. O substrato está representado como “RH” e o produto hidroxilado como “ROH” (adaptado de Guengerich, 2008).

### 2.1.4. Nomenclatura

A família CYP é uma das famílias proteicas mais conservadas entre espécies, tendo divergido a partir de um gene ancestral comum acerca de 1.36 mil milhões de anos. Embora todos os membros desta superfamília possuam regiões de resíduos de aminoácidos altamente conservadas, existem diferenças relativamente pequenas nas sequências de aminoácidos entre espécies, podendo originar alterações na especificidade do substrato e atividade catalítica (Martignoni *et al.*, 2006).

A identidade de sequências entre proteínas CYP é extremamente baixa e pode ser inferior a 20%. A maior conservação estrutural é encontrada no núcleo da proteína à volta de hemo e reflete o mecanismo comum de transferência de elétrões e prótons, e ativação do oxigénio (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

Com base na identidade das sequências, os CYPs são agrupados em famílias (1,2,3,...), subfamílias (A,B,C,...), e individualmente (1,2,3,...), por exemplo 1A1, 1A2 e 1B1. Nos mamíferos apenas um pequeno conjunto de CYPs parece exercer funções no catabolismo de produtos endógenos, a partir da síntese de esteróides e de eicosanóides - Tabela 1 (Guengerich, 2001).

**Tabela 1. Funções das famílias citocromo P450** (adaptado de Gibson *et al.*, 2001; Froy, 2009).

Família P450	Função
CYP1-3	Metabolismo dos esteroides e xenobióticos
CYP4	Metabolismo dos ácidos gordos
CYP5	Síntese de tromboxano
CYP7	Hidroxilação do colesterol
CYP8	Síntese de ácido biliar
CYP11	Síntese de esteroides
CYP17	Síntese de esteroides
CYP19	Aromatização de esteroides
CYP21	Hidroxilação do cortisol e aldosterona
CYP24	Hidroxilação da vitamina D
CYP26	Hidroxilação do ácido retinóico
CYP27	Colesterol 27-hidroxilase
CYP39	7 $\alpha$ -hidroxilação do 24-hidroxicolesterol
CYP51	Síntese de colesterol

### 2.1.5. Famílias citocromo P450 envolvidas no metabolismo de xenobióticos

Avanços na biologia molecular e na genómica facilitaram a caracterização bioquímica das enzimas CYP, o que revelou muita informação acerca deste sistema de enzimas metabolizadoras de fármacos. Os CYPs que metabolizam compostos exógenos ao organismo incluem-se exclusivamente nas famílias CYP1, CYP2, CYP3 e em menor extensão na família CYP4 (Nebert e Russell, 2002). Na Tabela 2 estão referidos as funções e os locais de expressão de CYPs de rato, de cada uma das famílias responsáveis pelo metabolismo dos xenobióticos.

Nos humanos e na maioria dos mamíferos, a família CYP1 contém três membros: o CYP1A1, o CYP1A2, o CYP1B1. Estas enzimas contribuem para o metabolismo de compostos endógenos, incluindo o 17 $\beta$ - estradiol, os retinoides, o ácido araquidônico e a melatonina. Estes CYPs têm sido extensivamente estudados devido ao seu papel na carcinogênese química (Chun e Kim, 2003; Wang *et al.*, 2011).

A enzima CYP1B1 é uma monooxigenase dependente de NADPH, envolvida na metabolização de vários substratos como os ácidos gordos, os esteroides e os xenobióticos (por exemplo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs) (Sissung *et al.*, 2006; Gajjar *et al.*, 2012). Apesar do CYP1B1 ser expresso em tecidos normais, os níveis são muito mais elevados em células tumorais em comparação com o tecido normal circundante (Sissung *et al.*, 2006).

A subfamília CYP2C constitui o principal grupo de CYPs no fígado de rato (Haduch *et al.*, 2011). Estes CYPs estão envolvidos nas reações de síntese de ácido biliar e hidroxilação andrógena, bem como na oxidação de vários xenobióticos (Li *et al.*, 2008). O CYP2C11 é a isoforma mais abundante, sendo expresso constitutivamente e especificamente do sexo masculino em rato, compreendendo mais de 50% do conteúdo CYP total do fígado (Li *et al.*, 2008; Haduch *et al.*, 2011; Wojcikowski *et al.*, 2013).

O CYP2C11 está envolvido na hidroxilação de alguns esteroides endógenos, tais como a testosterona e a androstenediona, a epoxigenação do ácido araquidônico e a hidroxilação da vitamina D<sub>3</sub> (Wojcikowski *et al.*, 2013). O CYP2C11 é regulado pela hormona de crescimento, sendo a sua expressão dependente da variação na secreção desta hormona, mais especificamente da frequência, duração e amplitude da sua oscilação (Haduch *et al.*, 2011; Wojcikowski *et al.*, 2013).

Os membros da família CYP3A constituem cerca de 25 a 35% do conteúdo CYP presente no fígado de humanos e ratos adultos (Rowlands *et al.*, 2000). A expressão de CYP3A de rato é dependente do género, tecido e estadio de desenvolvimento (Jan *et al.*, 2006). Os CYP3A estão envolvidos na hidroxilação de ácidos biliares e de esteroides, como o cortisol, a testosterona, a progesterona e o estradiol (E<sub>2</sub>), bem como na metabolização de alguns agentes psicotrópicos e analgésicos (Rowlands *et al.*, 2000).

O CYP3A9 está envolvido na hidroxilação da testosterona, do E<sub>2</sub> e da progesterona. A enzima CYP3A9 é a principal isoforma CYP3A expressa no cérebro de rato e, por isso, foi sugerido que esta pode desempenhar um papel importante na regulação dos níveis de neurosteróides no cérebro (Wang *et al.*, 2000). Os níveis de mRNA do CYP3A9 no cérebro e no fígado de rato demonstraram claramente que este CYP segue um padrão de dimorfismo sexual, sendo expressa predominantemente em fêmeas, enquanto o CYP3A18 é uma isoforma específica de ratos machos adultos (Rowlands *et al.*, 2000; Jan *et al.*, 2006).

**Tabela 2. Funções, locais de expressão e substratos dos genes CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9.** (adaptado de Ingelman-Sundberg, 2004; Thangavel *et al.*, 2007; Wojcikowski *et al.*, 2013; Jan *et al.*, 2006; Rowlands *et al.*, 2000).

	CYP1B1	CYP2C11	CYP3A9
Função Principal	Hidroxilação do estradiol	Hidroxilação de esteroides e vitamina D	Hidroxilação de ácidos biliares e esteroides
Locais de expressão	Rim, Coração, Cérebro, Ovários, Colón, Próstata e Glândula mamária	Fígado, Rim, Baço, Medula óssea, Coração, Pulmão e Cérebro	Fígado, Rim, intestino, Pulmão, Cérebro e Leucócitos
Compostos metabolizados	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, 7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]antraceno e Benzo(a)pireno	Benzo(a)pireno, Aflatoxina B <sub>1</sub> , Benzofetamina, Aminopirina e Antipirina	Pregnenolona 16 $\alpha$ -carbonitrilo, dexametasona, clotrimazol e fenobarbital
Expressão	Ambos os géneros	Machos	Fêmeas

## 2.2. Metabolismo dos xenobióticos no cérebro

Sendo o cérebro o principal órgão e centro do sistema nervoso em todos os animais vertebrados e em muitos invertebrados, este necessita de ser protegido contra substâncias endógenas, moléculas de sinalização e xenobióticos, que provêm da circulação sanguínea do organismo (Meyer *et al.*, 2010).

As barreiras presentes no cérebro têm um papel importante no controlo da movimentação de vários metabolitos, mas também de fármacos, entre o sangue e o cérebro - determinando as suas concentrações e efeitos no CNS (Saunders *et al.*, 2013). O acesso ao cérebro é restringido pela presença de duas barreiras: a barreira hemato-encefálica e a barreira sangue-CSF. A primeira tem como base as características das células epiteliais presentes nas paredes dos microvasos cerebrais, enquanto a segunda reside entre os capilares endoteliais e as células epiteliais do CP (de Lange, 2004).

Fundamental para todos os mecanismos de barreira do cérebro é a presença de *TJs*. As células endoteliais cerebrais, bem como as células epiteliais do CP estão conectadas por *TJs*. Sem estas junções os mecanismos de transporte ativo e passivo através das interfaces das barreiras seriam ineficazes (de Lange, 2004; Saunders *et al.*, 2013). Assim, a passagem de moléculas hidrofílicas entre as células é impedida. Para superar esta barreira anatómica, outros

mecanismos podem ser definidos como barreiras fisiológicas e farmacológicas no controle do acesso molecular para o cérebro e CSF (Saunders *et al.*, 2013).

As células que formam as interfaces das barreiras contêm uma variedade de enzimas metabolizadoras e transportadores que controlam a entrada e a saída de moléculas. Estas atingem o parênquima cerebral através de mecanismos de influxo e efluxo de nutrientes, produtos metabólicos, e iões altamente específicos (de Lange, 2004; Saunders *et al.*, 2013).

Várias enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos no fígado têm sido encontradas nos vasos sanguíneos ou em células circundantes no cérebro de ratos e de humanos. Enzimas como os CYPs, NADPH-CYP P450 redutase, EPH, enzimas de conjugação, tais como UGT e GST, e transportadores MRP e OAT foram detetadas. Todas essas enzimas podem servir como barreiras enzimáticas para influxo de fármacos no cérebro (Minn *et al.*, 2002; de Lange, 2004).

O cérebro representa um órgão único, tanto na heterogeneidade dos seus vários tipos de células (por exemplo neurónios, astroglia, oligodendroglia e microglia), bem como na sua diversificação em regiões anatómicas distintas com funções específicas. Curiosamente, a expressão de CYPs no cérebro segue esta tendência (Meyer *et al.*, 2010).

Os CYPs cerebrais são encontrados em grande extensão em células da glia nas regiões das barreiras cerebrais. Estes CYPs presentes nas barreiras atuam como um sistema de filtração inicial quando os fármacos entram no cérebro (Meyer *et al.*, 2010). A expressão diferencial de acordo com a região cerebral tem sido descrita, revelando um elevado conteúdo CYP no cerebelo e tronco cerebral, e baixos valores no estriado e hipocampo. Estas diferenças são semelhantes no rato e no Homem (Dutheil *et al.*, 2008).

Os CYPs são expressos em populações neuronais bem definidas: os CYP1A, 1B, 2A, 2G estão presentes na mucosa olfativa e o CYP1A1 no bolbo olfativo, no estriado, no hipotálamo e no córtex. O CYP2D4 é encontrado no cerebelo, no estriado e na medula oblongata do cérebro de rato e o CYP2D6 é expresso no córtex, no cerebelo, no mesencéfalo, no estriado e no tálamo do cérebro humano. O CYP3A está presente em áreas sensíveis a hormonas esteroides como o hipocampo, o hipotálamo, o bolbo olfativo e o cerebelo (Meyer *et al.*, 2010).

A atividade das enzimas que metabolizam os fármacos no cérebro é geralmente baixa, em comparação com a do fígado ou mucosa nasal (Minn *et al.*, 2002). No entanto, existem alguns fármacos que induzem apenas isoformas cerebrais, enquanto a expressão de CYPs hepáticos permanece inalterada (Meyer *et al.*, 2010). Como estas enzimas frequentemente produzem metabolitos reativos, o baixo nível de indução pode ser um mecanismo de proteção contra o risco de neurotoxicidade resultante de uma alta atividade de CYP. A entrega de fármacos ao CNS continua a ser um desafio, apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase do cérebro (Minn *et al.*, 2002; Dutheil *et al.*, 2008).

## 3. Ritmo Circadiano

Ao longo de milhares de anos, os organismos foram evoluindo e desenvolvendo estratégias de adaptação a alterações ambientais (Schulz e Steimer, 2009). Este ajuste fisiológico permitiu aos organismos desenvolver um sistema de detecção e resposta a estímulos, tais como a luz e a temperatura. Hoje em dia, como consequência desta adaptação, os mamíferos possuem osciladores endógenos que geram ritmicidade em várias funções fisiológicas, contribuindo para a preparação do organismo em resposta a estímulos (Schulz *et al.*, 2009; Paschos *et al.*, 2010).

A maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos oscila ao longo do tempo, num período relativamente constante. Os ciclos com um período de aproximadamente 24 horas são considerados ritmos circadianos, derivado das palavras latinas *circa diem* que significa aproximadamente um dia (Gachon *et al.*, 2004). Entre os parâmetros biológicos que são regulados por uma oscilação circadiana estão o ciclo sono/vigília, a taxa cardíaca, a pressão arterial, a temperatura corporal, as concentrações hormonais no sangue (por exemplo o cortisol, a melatonina e a insulina) e o metabolismo hepático (Schulz *et al.*, 2009).

Os ritmos circadianos são controlados por relógios internos que normalmente são regulados por estímulos periódicos (Yang, 2010). O *Zeitgeber* (ZT) ou sincronizador é um estímulo ambiental que sincroniza ou ajusta o ritmo dos relógios endógenos em todos os organismos, desde as cianobactérias até aos mamíferos (Reppert e Weaver, 2001; Dibner *et al.*, 2010). O ciclo claro/escuro é o ZT mais poderoso e robusto nos mamíferos (Reppert *et al.*, 2001). No entanto, estímulos externos como a alimentação e a temperatura também são *Zeitgebers* (ZTs) importantes na sincronização dos relógios internos (Yang, 2010).

No sistema circadiano dos mamíferos, a maioria das células contém osciladores circadianos autossustentados e autônomos, ou seja, ritmos que podem persistir mesmo na ausência de sinais exógenos (Dibner *et al.*, 2010). Para um funcionamento correto do sistema circadiano, todos os relógios circadianos do organismo devem estar sincronizados. Esta é a função do oscilador circadiano central, localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (SCN) (Welsh *et al.*, 2010).

### 3.1. Oscilador circadiano central

Nos mamíferos, o cérebro desempenha um papel importante no controlo e coordenação dos ritmos circadianos (Sukumaran *et al.*, 2010). É neste órgão que se encontra o relógio

circadiano principal, num pequeno núcleo bilateral localizado na parte anterior do hipotálamo, denominado de SCN (Hastings *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2009).

O SCN é composto por aglomerados de neurónios maioritariamente GABAérgicos, encontrando-se subdivido em duas zonas anatomicamente e funcionalmente diferentes - uma região ventral “nuclear” e uma região dorsal “capsular” - em que cada uma destas sub-regiões contém diferentes tipos de neurónios especializados (Hastings *et al.*, 2007; Levi e Schibler, 2007).

O SCN é composto por aproximadamente 20.000 neurónios, em que cada neurónio é uma célula osciladora autónoma. No entanto, o SCN funciona como uma rede, em que todas as células oscilam de forma coerente (Mohawk *et al.*, 2012). É por meio de sinalização sináptica e parácrina que os neurónios se mantêm sincronizados como um todo para o funcionamento do SCN (Levi *et al.*, 2007). Neurotransmissores como o glutamato, ácido gama-aminobutírico e norepinefrina, bem como os neuropéptidos arginina-vasopressina, péptido vasoativo intestinal e péptido histidina-isoleucina, estão envolvidos nas vias de sinalização parácrina necessária para a sincronização dos neurónios no SCN (Levi *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2009).

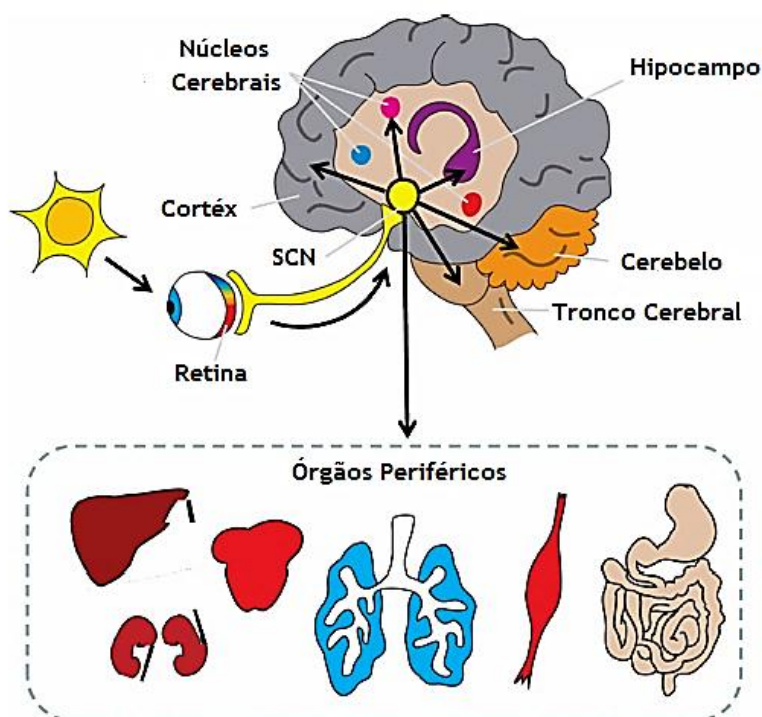
No entanto, o SCN também regula a fisiologia circadiana através de conexões sinápticas para vários núcleos cerebrais e, através do sistema nervoso autónomo, para órgãos periféricos (Levi *et al.*, 2007).

### **3.1.1. Aferências e eferências do núcleo supraquiasmático**

Para adaptar a fisiologia de um organismo a alterações ambientais, a informação proveniente do exterior atinge estruturas que integram essa informação e a enviam aos vários tecidos do organismo. O SCN tem a capacidade de funcionar como um intermediário entre o ambiente exterior e o interior do organismo (Figura 7) (Dibner *et al.*, 2010).

Neste sentido, o SCN recebe informação através de três principais vias aferentes: o trato retinohipotalâmico (RHT), o trato geniculohipotalâmico (GHT) e as terminações serotoninérgicas dos núcleos de rafe dorsal e mediano (respetivamente DRN e MRN). O RHT intervém na transferência da informação luminosa proveniente do exterior, enquanto o GHT e os núcleos de rafe fornecem informação não luminosa para o SCN (Dibner *et al.*, 2010).

O ciclo claro/escuro é claramente o ZT principal para o relógio central. Os sinais luminosos são detetados por células fotoreceptoras da retina, bastonetes e cones, bem como por células ganglionares que expressam o fotopigmento melapsonina. Seguidamente, estes sinais são transmitidos como sinais elétricos para os neurónios do SCN via RHT (Levi *et al.*, 2007; Sukumaran *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012).



**Figura 7. Componentes do sistema circadiano dos mamíferos.**

As alterações na luz devido ao ciclo de dia/noite são detetadas diretamente pela retina. A informação de luz é transmitida para o núcleo supraquiasmático (SCN). O SCN funciona como um oscilador circadiano onde a ritmicidade circadiana é gerada. Esta é convertida em sinais que controlam o comportamento, a fisiologia e o metabolismo dos organismos (adaptado de Kondratova *et al.*, 2013).

Para funcionar como oscilador central para o cérebro e tecidos periféricos, a sinalização intrínseca deve ser transmitida a partir do SCN (Dibner *et al.*, 2010). Eferências a partir do SCN são direcionadas para outras partes do hipotálamo que controlam a secreção hormonal da pituitária anterior e posterior, bem como áreas do hipotálamo e medula que controlam o sistema nervoso autónomo. Estes *outputs* hormonais e autónomos transmitem a ritmicidade nos ciclos claro/escuro para o resto do corpo (Sukumaran *et al.*, 2010).

### 3.2. Osciladores Circadianos

A presença de relógios circadianos extra-SCN tem sido explorada nos últimos anos. Análises moleculares revelaram que genes *clock* são amplamente expressos em quase todos os tipos de células/tecidos nos vertebrados. Cerca de 3 a 20% dos genes expressos num organismo exibem uma expressão rítmica circadiana, em que uma grande proporção destes desempenha um papel importante em processos metabólicos, como o metabolismo da glucose e lípidos (Maury *et al.*, 2010).

O SCN pode coordenar o comportamento circadiano de outros osciladores dependendo das suas características, o que permite classificá-los como osciladores semiautónomos ou osciladores designados de *slaves* (Guilding e Piggins, 2007).

Os osciladores semiautónomos são regiões do cérebro que geram ritmos circadianos celulares autónomos, no entanto, ainda exigem a ajuda de um relógio central para sincronização destes ritmos celulares, gerando um ritmo coerente dentro do tecido, como é o caso da habénula (Guilding *et al.*, 2007; Dibner *et al.*, 2010). Esta estrutura do tálamo recebe diretamente projeções luminosas da retina e indiretamente pelo SCN, que em conjunto com o núcleo de accumbens, projeta informação para a glândula pineal, o núcleo de rafe, a substância *nigra*, e a área tegmental ventral (Dibner *et al.*, 2010).

Os osciladores *slaves* são regiões do cérebro que têm a capacidade de oscilar sob o controlo de osciladores centrais ou intermédios, como é o caso da amígdala, que tem como função integrar sinais autónomos, cognitivos e emotivos (Guilding *et al.*, 2007; Dibner *et al.*, 2010).

A descoberta dos genes *clock* permitiu a identificação de outras áreas cerebrais que continham a maquinaria molecular necessária para a geração de ritmos circadianos (Dibner *et al.*, 2010). Oscilações diárias têm sido identificadas em inúmeras regiões do cérebro, incluindo os núcleos do tálamo e o hipotálamo, a amígdala, a habénula, o bulbo olfativo, o cerebelo e o plexo coróide (Dibner *et al.*, 2010; Albrecht, 2012; Quintela *et al.*, 2014; Rath *et al.*, 2014). De entre estas regiões, os ritmos mais robustos, para além dos observados no SCN, são encontrados nos bulbos olfativos e tecidos que têm funções neuroendócrinas, como o núcleo arqueado, os núcleos paraventriculares e a glândula pituitária (Albrecht, 2012).

Para além disso, têm sido encontrados osciladores circadianos independentes em vários tecidos periféricos em mamíferos (Maury *et al.*, 2010). Os relógios periféricos parecem agir como integradores de sinais do relógio central, através de sinais de luz ou de outros sinais fisiológicos (Yang, 2010).

### 3.3. Mecanismo Molecular do Ritmo Circadiano

O mecanismo circadiano no SCN e nos osciladores periféricos é semelhante a nível molecular; no entanto, as vias eferentes induzidas podem ser diferentes e mais específicas para cada tecido (Rana e Mahmood, 2010). O relógio molecular é composto por dois mecanismos principais: uma rede de *loops* (circuitos) de *feedback* de transcrição-tradução interligados e por modificações pós-translacionais de proteínas, como por exemplo a fosforilação (Rana *et al.*, 2010; Albrecht, 2012).

Os componentes centrais do relógio molecular incluem duas famílias gênicas: Período (Per) e Cryptocromo (Cry). Nos mamíferos, a expressão de três genes Per (Per1, Per2 e Per3) e dois genes Cry (Cry1 e Cry2) é ativada pelo dímero proteico formado pelo *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (Clock) e pelo *Brain-Muscle Arnt-Like protein 1* (Bmal1). O Clock e Bmal1 são fatores de transcrição que heterodimerizam e induzem a expressão de genes Per e Cry. Esta indução resulta da ligação a elementos E-box presentes na região promotora dos genes. As proteínas PER e CRY são sintetizadas no citoplasma, no entanto associam-se e deslocam-se para o núcleo. No núcleo, CRY reprime a atividade de CLOCK e BMAL1, e desta maneira, através de feedback negativo inibem a sua expressão. Para além disso, o heterodímero CLOCK-BMAL1 também induz a transcrição de outros genes, nomeadamente o recetor nuclear (Rev-Erba) e o recetor órfão relacionado ao ácido retinóico alfa (ROR $\alpha$ ). Estas proteínas vão depois competir pela ligação a elementos responsivos (RRE) presentes na região promotora de BMAL1: a ROR $\alpha$  induz a transcrição de BMAL1 e Rev-Erba inibe-a (Figura 8) (Rana *et al.*, 2010).

A nível de modificações pós-traducionais, PER e CRY são fosforilados pela enzima caseína quinase I, isoformas delta e a épsilon. Desta forma, a fosforilação dos heterodímeros PER e CRY ocorre de uma forma rítmica e progressiva, permitindo portanto que o circuito recomece de novo (Rana *et al.*, 2010).

### 3.4. Ritmo circadiano e Metabolismo dos xenobióticos

Nos mamíferos, o relógio circadiano controla muitos aspetos do seu comportamento e fisiologia, como a temperatura corporal, a pressão arterial, as funções endócrinas, o fluxo plasmático renal e o metabolismo (Gachon *et al.*, 2006). Os osciladores circadianos podem intervir na fisiologia de forma rítmica em tecidos periféricos, através de fatores de transcrição circadianos, que por sua vez, regulam a transcrição de genes a jusante. Entre estes fatores de transcrição estão o REV-Erba e o *PAR-domain basic leucine zipper* (PARbZip) que reprimem ou ativam respetivamente, os genes alvo (Gachon *et al.*, 2006; Claudel *et al.*, 2007).

Nos transcritos que seguem um padrão de expressão circadiana estão componentes importantes no metabolismo dos xenobióticos, como os CYPs. Diferentes estudos demonstraram que estas enzimas apresentam um padrão de expressão circadiana não só no fígado, o principal local de metabolização xenobiótica, mas também em tecidos periféricos (Košir *et al.*, 2013).

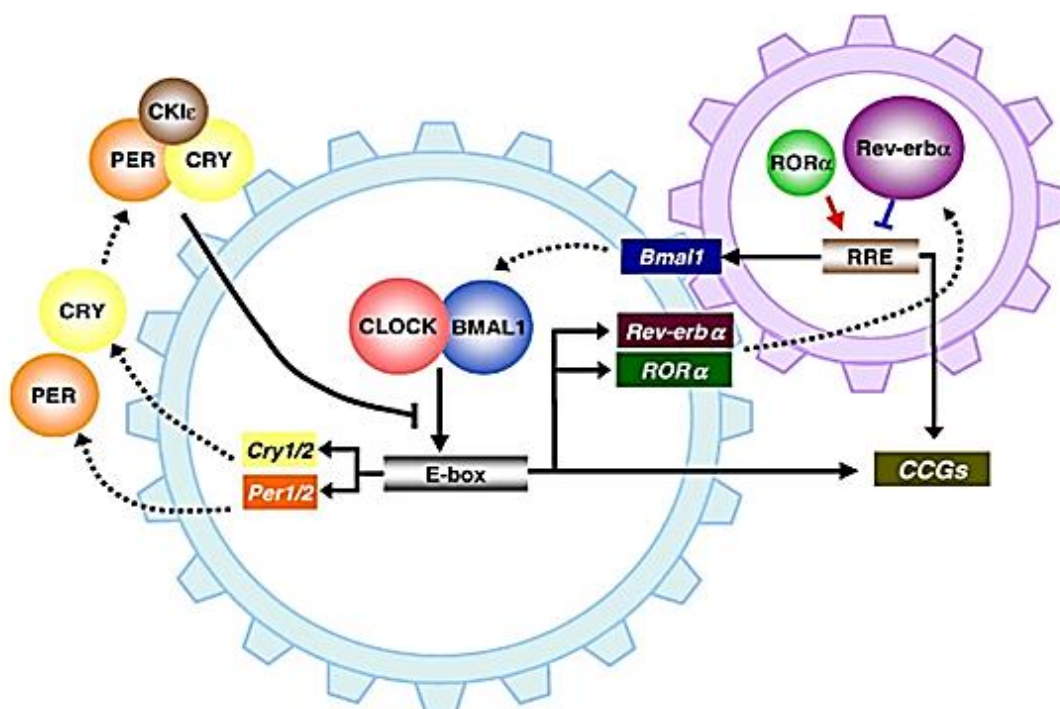


Figura 8. Mecanismo molecular do ritmo circadiano nos mamíferos.

O relógio molecular é composto por dois mecanismos principais: circuitos de *feedback* de transcrição-tradução interligados e modificações pós-translacionais de proteínas. No circuito de *feedback negativo*, o heterodímero BMAL1/CLOCK liga-se a elementos E-box presentes nos genes *Per* e *Cry*, ativando assim a sua transcrição. As proteínas PER e CRY acumulam-se no citoplasma e formam heterodímeros que quando atingem determinada concentração se deslocam para o núcleo, onde interagem com os heterodímeros BMAL1/CLOCK para inibir a sua transcrição. Posteriormente, o complexo PER e CRY é degradado pela caseína quinase I (CKI) e os heterodímeros BMAL1/CLOCK iniciam um novo ciclo de transcrição. O heterodímero BMAL1/CLOCK também controla a transcrição dos receptores nucleares Rev-Erb $\alpha$  e ROR $\alpha$ , que modulam os níveis de mRNA de BMAL1 por ações competitivas por elementos responsivos (RRE) no promotor do BMAL1. REV-ERB $\alpha$  inibe, enquanto ROR $\alpha$  ativa a transcrição de *Bmal1*. Para além disso, os componentes do relógio circadiano também determinam os níveis de expressão de *clock-controlled genes* (CCGs) via E-box e / ou RRE atingindo os seus padrões de oscilação e, portanto, gerando ritmicidade fisiológica. (adaptado de Mohawk *et al.*, 2012).

Os CYPs são regulados não diretamente pelo heterodímero CLOCK/BMAL1, mas indiretamente através de genes que codificam proteínas PARbZip e receptores nucleares como RevErb  $\alpha$ , RevErb  $\beta$ , Ror  $\gamma$ , Ppar  $\alpha$ , Ppar $\delta$ , e Ppar $\gamma$  (Zmrzljak e Rozman, 2012; Košir *et al.*, 2013). De facto, murganhos knockout ROR  $\alpha$  e Ror  $\gamma$  apresentam uma expressão alterada de muitas enzimas fase I e II, além da expressão alterada do recetor de xenobióticos CAR (Gachon e Firsov, 2011).

Embora alguns dos genes possam ser alvos diretos de fatores de transcrição PARbZIP, outros podem ser regulados indiretamente através CAR (Gachon *et al.*, 2006). Na presença de alguns ativadores de xenobióticos e endógenos, CAR dissocia-se do seu complexo com chaperones e estimula a expressão do gene alvo com isoformas do recetor retinoide X (RXR). O RXR é outro recetor importante no metabolismo dos xenobióticos, no entanto não parece ser regulado por fatores de transcrição PARbZip no fígado, não demonstrando assim ritmicidade (Gachon *et al.*, 2006; Zmrzljak *et al.*, 2012).

Está agora bem estabelecido que os ritmos biológicos podem influenciar a resposta a fármacos, e que muitos fatores fisiológicos, possivelmente implicados em diferentes etapas do destino dos medicamentos no organismo (por exemplo, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) podem variar ao longo de 24 h, incluindo gastrointestinal, cardiovascular, hepático e alterações renais (Bruguerolle *et al.*, 2008).

Para além do impacto do ritmo circadiano no metabolismo dos fármacos e desintoxicação xenobiótica, também existem evidências que o ritmo circadiano pode ser alterado devido à presença de xenobióticos. A nível molecular, a exposição xenobiótica pode alterar significativamente a expressão de genes *clock* por diferentes vias. Através da perturbação do relógio circadiano, e conseqüentemente variação da expressão de genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos, alguns fármacos alteram o seu próprio metabolismo e a sua toxicidade (Claudel *et al.*, 2007).

### 3.5. Disrupção do ritmo circadiano

Os ritmos circadianos desempenham um papel importante na manutenção da homeostase e funcionamento normal de um organismo (Sukumaran *et al.*, 2010). Irregularidades no ritmo circadiano, como alterações no ciclo sono/vigília e na secreção hormonal (por exemplo a melatonina), podem afetar as funções bioquímicas e fisiológicas normais (Salgado-Delgado *et al.*, 2011).

Os efeitos da disrupção circadiana podem ir desde condições menores e facilmente reversíveis, até graves danos para o organismo (Sukumaran *et al.*, 2010). Para a fisiologia e comportamento normal de um indivíduo, é crucial ter um sono suficiente e satisfatório, pois é durante o sono que acontece uma série de eventos fisiológicos relevantes incluindo, reparação celular e recuperação mental, necessários para a saúde e bem-estar. A serotonina, um neurotransmissor que modula o estado de humor, diminui os seus níveis durante a noite, enquanto a melatonina, uma hormona que é sintetizada na glândula pineal, é libertada durante a noite, induzindo o sono e, estimula a reparação do DNA (Salgado-Delgado *et al.*, 2011).

Como referido anteriormente, o ciclo claro/escuro é importante na sincronização do relógio biológico nos organismos, assim alterações na exposição à luz podem alterar a ritmicidade circadiana interna (Salgado-Delgado *et al.*, 2011). O *jetlag* é um caso comum e simples onde é observada disrupção circadiana. Alterações nos fusos horários muitas vezes causam distúrbios do sono e defeitos cognitivos temporários. Estas transformações foram observadas em experiências com ratos submetidos a uma mudança brusca no ciclo de luz/escuro, em que os animais apresentaram um aumento do seu período noturno (ativo) (Sukumaran *et al.*, 2010).

Outro clássico exemplo que ilustra a disrupção circadiana é o trabalho por turnos, em que há uma alteração dos padrões típicos do sono. Estudos sugerem que a incidência de cancro, doenças psicológicas, diabetes e doenças cardiovasculares é maior entre indivíduos que trabalham por turnos (Sukumaran *et al.*, 2010).

A disfunção circadiana pode ser induzida não só por alterações ambientais, mas também por falhas moleculares no relógio circadiano (Zelinski *et al.*, 2014). Quando há disrupção do ritmo circadiano, alterações epigenéticas podem alterar a proliferação celular, potenciando o desenvolvimento de cancro (Rana *et al.*, 2010).

## II. Objetivo

Um estudo de *microarrays* de DNA complementar (cDNA), realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, demonstrou a presença de vários genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos em CP de ratos fêmea e macho (Quintela *et al.*, 2013). Outros estudos demonstraram que os ritmos biológicos podem influenciar a resposta a fármacos, e que muitos fatores fisiológicos possivelmente implicados em diferentes etapas de transformação dos fármacos apresentam variação circadiana (Bruguerolle *et al.*, 2008). Assim, com base nestes fundamentos, investigou-se a presença de citocromos P450 envolvidos no metabolismo de xenobióticos, e analisou-se a sua expressão circadiana em CP de ratos fêmea e macho.

Sugerindo que o CP estará envolvido na metabolização de xenobióticos, traçaram-se os seguintes objetivos:

- Confirmar a expressão dos genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos, CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9, em CP de ratos fêmea e macho, e analisar a localização destas enzimas;
- Avaliar o papel do ritmo circadiano na expressão do gene CYP1B1;
- Analisar o efeito da disrupção do ritmo circadiano na expressão do gene CYP1B1;
- Estudar o efeito do E<sub>2</sub> e do benzo(a)pireno (BaP) na expressão do gene CYP1B1.



## III. Metodologia

### 1. Animais

No presente trabalho experimental, foram utilizados ratos *Wistar Han* (espécie *Rattus norvegicus*) com cerca de 2 meses de idade para extração de RNA total (RNAt) e de proteína total de CP, bem como para análises de imunohistoquímica por fluorescência. As culturas primárias de CPEC foram realizadas a partir de CPs de animais recém-nascidos da mesma espécie (3 a 5 dias).

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

#### 1.1. Recolha dos plexos coróides de rato a diferentes *zeitgebers*

Num estudo, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, 24 ratos fêmea e 24 ratos macho, com 2 meses de idade foram divididos em 4 grupos, cada um constituído por 6 ratos fêmea e 6 ratos macho que foram sacrificados de 6 em 6 horas. Os animais foram sujeitos a um fotoperíodo normal (12 horas luz: 12 horas de escuro) e posteriormente decapitados em tempos de ZT diferentes: ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19, sendo esses tempos correspondentes às 08:00, 14:00, 20:00 e 02:00 horas, respetivamente. Após recolha do CP, foi realizada a extração de RNA e síntese de cDNA. Com o objetivo de minimizar o número de animais e para verificar se o CYP1B1 era regulado pelo ritmo circadiano, utilizou-se o mesmo RNA de uma experiência anteriormente realizada pelo nosso grupo.

#### 1.2. Recolha dos plexos coróides de rato após disrupção do ritmo circadiano

Nesta experiência foram utilizados 32 ratos (16 fêmeas e 16 machos) com cerca de 2 meses de idade, que foram divididos em 2 grupos, um dos quais exposto a escuridão constante (EE) e, o outro exposto a luz constante (LL). Cada grupo foi subdividido em 8 fêmeas e 8 machos. Os animais tiveram acesso a alimentação e fornecimento de água *ad libitum*. Ao terceiro dia de exposição a LL ou EE, os animais foram anestesiados com CO<sub>2</sub> e, posteriormente sacrificados. O sacrifício dos animais, no caso do grupo exposto a EE ocorreu na ausência de luz, de modo a não interferir nos resultados. Além disso, o sacrifício dos animais ocorreu de

forma alternada entre fêmeas e machos. Os CPs foram recolhidos de imediato, congelados em azoto líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA.

Os resultados da experiência anterior (secção 1.1.) foram utilizados como grupo controlo desta experiência, visto que os animais estiveram expostos a um fotoperíodo normal.

## 2. Cultura primária de células epiteliais do plexo coróide de rato

Ratos recém-nascidos com 3 a 5 dias foram utilizados para recolha de CPs dos ventrículos laterais. Os CPs foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS) 1x até à sua digestão com 0.2% da enzima Pronase (Fluka, Seelze, Germany) durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Retiraram-se os CPs da solução de digestão e colocaram-se em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Life Technologies, Inc., Paisley, UK) completo, que contém 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom AG, Berlin) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma, Saint Louis, USA), seguindo-se uma centrifugação a 410 RCF durante 2 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado novamente no mesmo meio de cultura, seguindo-se uma segunda centrifugação nas mesmas condições. Rejeitou-se novamente o sobrenadante, e as células foram ressuscitadas em DMEM suplementado com fator de crescimento epidérmico (Sigma), insulina (Sigma) e citosina arabinosine C (Sigma). Posteriormente semearam-se as células em placas de 12 poços com cerca de 1.5 mL de DMEM suplementado. O meio de cultura foi substituído no dia seguinte e as células foram mantidas em cultura durante mais 4/5 dias, período após o qual se observou a sua diferenciação, proliferação e formação de uma monocamada confluenta.

### 2.1. Estímulos com Estradiol e Benzo(a)pireno

Com o objetivo de avaliar o efeito do  $\text{E}_2$  (Sigma) e do BaP (Sigma) na expressão do gene CYP1B1, foram realizados estímulos em CPEC com cada um destes compostos. Previamente à incubação, o meio de cultura foi substituído por novo meio suplementado.

O estímulo com estradiol (dissolvido em etanol a 99,9%) foi realizado com concentrações de 0, 10, 100 e 500nM, durante 24 horas. Por outro lado, o estímulo com BaP (dissolvido em 99,9% de Dimetilsulfóxido) foi efetuado com concentrações de 0, 1, 5  $\mu\text{M}$ , durante 6 horas. Posteriormente, as células foram recolhidas em 200 $\mu\text{L}$  de Trizol e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA e análise por PCR em tempo real.

## 3. RNA total

### 3.1. Extração de RNA total de plexo coróide

A extração de RNA a partir de tecidos ou células, consiste no primeiro passo para estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos. Dada a labilidade do RNA, é necessário assegurar as condições ótimas que mantêm a sua integridade e qualidade, durante os passos do isolamento. Esta tarefa torna-se extremamente difícil, especialmente devido à ação enzimática das ribonucleases (RNases), que são extremamente resistentes e degradam rapidamente o RNA. Deste modo, utilizam-se fortes agentes desnaturantes, como fenóis e sais de guanidina, que efetuam a lise celular e usam-se inibidores das RNases (dietilpirocarbonato, DEPC). Para além disso, a utilização de material esterilizado e o uso de luvas, bem como a realização de todo o procedimento em gelo (devido à sensibilidade térmica), influenciam o resultado final da extração de RNAt.

A extração de RNAt foi efetuada com o reagente TRIzol (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. Desta forma, para extrair RNAt do CP de rato foram adicionados 300 µL de reagente TRIzol (1mL TRIzol / 100mg de tecido), que consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, a cada microtubo de 1.5mL contendo um par de CPs. Posteriormente, os tecidos foram macerados manualmente com o auxílio de um pilão, o que permitiu o rompimento das células e manutenção da integridade pela ação do TRIzol. Seguidamente incubou-se o homogeneizado à temperatura ambiente durante 5 minutos e adicionou-se 60 µL de clorofórmio (VWR) (200 µL clorofórmio / 1 mL TRIzol), possibilitando assim a solubilização dos lípidos para posterior remoção. Agitou-se por inversão o microtubo e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 4 °C a 12000g durante 15 minutos, o que permitiu a sua separação, fraccionada em três fases: fase orgânica (cor de rosa no fundo) que contém as proteínas, a interfase (esbranquiçada) onde está presente o DNA e proteínas desnaturadas e a fase aquosa (transparente, na superfície) que contém o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou 150 µL de isopropanol (Fisher) (500 µL isopropanol / 1 mL TRIzol) e misturou-se por inversão, permitindo a recuperação do RNA por precipitação com este álcool. Após a solução ter sido incubada 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 4 °C a 12000g durante 10 minutos, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA sob a forma de um precipitado branco, foi lavado duas vezes, com 500 µL de etanol 75% em água DEPC a - 20 °C e centrifugado a 4 °C durante 5 minutos a 7500g. De seguida, rejeitou-se novamente o sobrenadante e retirou-se o excedente de etanol sem secar completamente o sedimento. Por fim, reidratou-se o precipitado em 10 µL de água DEPC, que foi armazenado a -80 °C para uso posterior.

### 3.2. Determinação da integridade do RNA total

Para analisar a integridade do RNAt, as amostras foram corridas em gel de agarose a 1% corado com o agente intercalante de ácidos nucleicos *Greensafe premium* (NZYTech) e observadas sob radiação ultravioleta. A integridade do RNA foi confirmada pela presença das bandas de rRNA, 18S e 28S, em que esta última deve apresentar o dobro da intensidade da primeira. Se esta proporção de aproximadamente 2:1 na intensidade das bandas não se verificar ou se existir um arrastamento, isso pode ser uma indicação de que o RNA está degradado.

O gel de agarose a 1% foi preparado com 0.4g de agarose em 40 mL de Tampão TAE 1x, diluído em água DEPC. O *Greensafe premium* foi adicionado, a solução homogeneizada e depositada no molde para o gel. As amostras foram preparadas com solução de deposição (2 µL de amostra, 8 µL água estéril e 1 µL de *loading buffer* 10x) e depositadas no gel. O gel correu durante 30 minutos a uma voltagem de 100V, sendo posteriormente visualizado no transluminador UV.

### 3.3. Quantificação do RNA total

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

## 4. Síntese de DNA Complementar

O cDNA é uma cópia de DNA sintetizado a partir de RNA como molde. A síntese de cDNA foi realizada com uma transcriptase reversa (M-MLV), uma DNA polimerase dependente de RNA, isolada de um retrovírus (*Moloney Murine Leukemia Virus*). Para a atuação desta enzima é necessária a presença de indicadores de síntese, os *primers*. Na reação de transcriptase reversa podem ser usados *primers* específicos para o gene em análise, oligo(dT), ou oligonucleotídeos de constituição aleatória: os hexanucleotídeos.

Na transcrição reversa realizada neste trabalho experimental utilizou-se a NZY Reverse Transcriptase (NzyTech, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. Em primeiro lugar,

preparou-se uma mistura 1 (para n+1 reações) num microtubo que continha 2  $\mu\text{L}$  de Random Primers (0.5  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM) por cada amostra. A seguir, adicionaram-se 4  $\mu\text{L}$  da mistura 1 para um novo microtubo e cerca de 500 ng de RNAt, perfazendo com água estéril para um volume final de 17  $\mu\text{L}$ . Esta mistura foi então incubada no termociclador a 65°C durante 5 minutos e seguidamente arrefecida em gelo. De seguida, a cada microtubo adicionou-se uma mistura 2 constituída por 2  $\mu\text{L}$  de Tampão RT (5x Buffer) e 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV. Seguiu-se uma incubação a 37°C durante 50 minutos e posteriormente a 70°C durante 15 minutos. O cDNA resultante foi armazenado a - 20°C para posterior utilização.

## 5. RT-PCR

A técnica de amplificação enzimática de DNA (RT-PCR) permitiu confirmar a expressão dos genes do metabolismo dos xenobióticos: CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9, a partir de cDNA de CP de rato. O desenho dos *primers* para cada gene foi realizado através do programa Primer-Blast (Tabela 4).

Tabela 3. *Primers* dos genes da via do metabolismo de xenobióticos.

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5'-3')	Fragmento (pB)
CYP1B1	Fw- GGA TGT GCC TGC CAC TAT T Rv- CGT ATG GTA AGT TGG GTT GG	188
CYP2C11	Fw- GAA AGA CAG GAG CCA GAT GC Rv- GGT CAA ACT TCT CTG GAT TAG G	209
CYP3A9	Fw- CTA CCT TCA CAA ACC GAC G Rv- GAA GGT TGG AGA CAG CAG G	113

De forma a amplificar as sequências dos genes em estudo, realizou-se PCR, seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante da enzima (Tabela 4). Em cada reação foram usados 25  $\mu\text{mol}$  de *primer* Fw e 25  $\mu\text{mol}$  de *primer* Rv para o gene em estudo e 2  $\mu\text{L}$  de cDNA. No controlo negativo não se adicionou cDNA.

Posteriormente, os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose 1.5% na presença de Green Safe. Foram depositados 8  $\mu\text{L}$  de cada produto de PCR, aos quais foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de *loading buffer* 10x. No primeiro poço do gel foram depositados 4  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular HipperLadder II (Bioline, Reino Unido). Após a visualização do gel num transiluminador (UVITEC) e confirmação do peso molecular de cada banda, os produtos de PCR foram enviados para sequenciação à empresa StabVida (Portugal).

Os resultados de sequenciação foram analisados através do programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), por comparação com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*.

Tabela 4. Condições utilizadas na amplificação dos genes da via do metabolismo de xenobióticos.

Genes	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Enzima	Programa do termociclador
CYP1B1	56	<i>Taq DNA Polymerase</i>	35 x { 95°C (5 min) 95°C (30 seg) 56°C (45 seg) 72°C (45 seg) 72°C (5 min)
CYP2C11	62	<i>Dream Taq Polymerase</i>	40 x { 95°C (5 min) 95°C (30 seg) 56°C (45 seg) 72°C (45 seg) 72°C (5 min)
CYP3A9	60	<i>Phusion DNA polymerase</i>	35 x { 98°C (30 seg) 98°C (10 seg) 60°C (30 seg) 72°C (30 seg) 72°C (10 min)

## 6. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real combina a metodologia de RT-PCR convencional com um mecanismo de detecção por fluorescência em tempo real. A quantificação do mRNA da enzima do metabolismo dos xenobióticos, nomeadamente o CYP1B1, foi efetuada utilizando o kit Maxima SYBR®Green/ROX (Fermentas).

As condições da reação de amplificação foram otimizadas com testes de eficiência realizados com 4 concentrações de cDNA (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8). O gene da Ciclofilina A foi utilizado como controlo endógeno, para normalizar os níveis de expressão do gene em estudo. Todas as experiências de PCR em tempo real foram efectuadas em duplicado, com 6 amostras de cada grupo de animais, tendo sido realizadas no termociclador iCycler Iq™ (Bio-Rad).

As reações de amplificação, para cada um dos genes, CYP1B1 e Ciclofilina A, foram preparadas para um volume final de 20 µL, do seguinte modo: 10 µL de Syber green, 0.8 µL de *primer Fw* e 0.8 µL de *primer Rv* diluídos 1:20, 2 µL de cDNA e por fim, perpez-se o volume com água estéril (Fermentas). As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos. A formação de dímeros de *primers* e a especificidade do produto amplificado

foram avaliadas através da análise das curvas de *melting*. Os níveis relativos de expressão das enzimas em estudo nos diferentes grupos foram calculados pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (Pfaffl, 2001).

## 7. Imunohistoquímica por fluorescência em Whole-Mount

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *Whole-Mount* utilizada neste trabalho baseia-se no uso de anticorpos específicos para localização e distribuição celular de uma determinada proteína num tecido. O método utiliza anticorpos primários, específico para a proteína, e um anticorpo secundário marcado com uma molécula fluorescente, ocorrendo emissão de fluorescência quando há interação anticorpo primário/antígeno. Foram utilizados ratos Wistar Han (P3-P5), aos quais foram retirados os CPs e colocados em placas de 24 poços com Paraformaldeído (PFA) 4% durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os CPs foram incubados com uma solução de sacarose 30% até depositarem, e incubados *overnight* a 4°C com a solução de bloqueio 2.5% BSA 0.2% Triton. Os CPs foram lavados 2 vezes em tampão fosfato salino - tween (PBS-T) 0.1% e incubados *overnight* a 4°C, com os anticorpos primários CYP1B1 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), CYP2C11 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou CYP3A9 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) - diluídos 1:100 em BSA 2.5% 0.2% Triton. Os tecidos foram lavados 6 vezes em PBS-T 0.1% e incubados 3 horas à temperatura ambiente e no escuro com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes, EUA) diluído 1:1000 em BSA 2.5% 0.2% Triton. Realizaram-se mais 6 lavagens com PBS-T 0.1% e incubou-se com Hoescht 33342 dye do kit Image-iT™ Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (Molecular Probes, EUA) numa diluição de 1:1000 durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Por fim, os tecidos foram lavados 2 vezes com PBS-T 0.1% e foram montados em lâminas com Entellan (meio de montagem), observadas e fotografadas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha).

## 8. Imunocitoquímica por fluorescência

A imunocitoquímica utiliza anticorpos específicos para deteção de antígenos presentes em células, avaliando o nível de expressão de uma proteína e a sua distribuição celular.

Esta técnica foi realizada em CPEC, semeadas em lamelas numa placa de 12 poços. Lavaram-se as lamelas 2 vezes com PBS 1x e permeabilizaram-se com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens com PBS 1x e incubaram-se as células com uma solução de 1% Triton X-100 em PBS 1x durante 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens e uma incubação das CPEC, durante 1 hora, numa solução de bloqueio (PBS-T 0.1% e FBS 20%) à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas 3 vezes

com PBS-T 0.1% e incubadas *overnight* com o anticorpo primário respetivo anti-CYP1B1, anti-CYP2C11 ou anti-CYP3A9 (diluição de 1:100 em PBS-T 0.1% com FBS 1%), à temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se 6 lavagens com PBS-T a 0.1% e uma incubação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (H+L, Molecular Probes) diluído de 1:1000 em PBS-T 0.1% com FBS 1% durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após 3 lavagens com PBS-T 0.1%, as células foram incubadas com o Hoescht 33342 dye do kit ImageiT™ 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 Entellan (meio de montagem), tendo sido depois observadas e fotografadas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha).

## 9. Western Blot

A técnica de Western Blot é utilizada na deteção de uma proteína específica a partir de extratos de proteína total. Esta técnica inicia-se com a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, as quais são transferidas do gel para uma membrana de *nylon* e posteriormente detetadas com anticorpos específicos. Procedeu-se à extração de proteína total de CPs de Ratos *Wistar Han*, através de homogeneização em tampão de extração (100 µL de tampão/CP). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 10.000g durante 10 minutos a 4°C e, foi recolhido o sobrenadante.

A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford, utilizando-se como padrão a BSA (Sigma). As amostras de proteína foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos, aplicadas no gel em paralelo com um marcador de peso molecular (NZYColour Protein Marker II) e foi efetuada a corrida a 120 V durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham) foram cortadas à medida (6x9 cm) e ativadas em metanol durante 1 minuto, água durante 5 minutos e em solução de eletrotransferência (10 mM CAPS em metanol 10%, pH 11) durante 5 a 15 minutos. Colocou-se o papel de filtro, o gel e a membrana na sanduiche e efetuou-se a eletrotransferência a 4°C a 750 mA durante 1 hora e 30 minutos. Após a eletrotransferência, retirou-se a membrana do sistema e procedeu-se ao seu bloqueio com a solução *Tris-buffered saline* (TBS) 0.1% contendo Tween 20 (Applichem, Darmstadt, Germany, TBS-T) e 5% leite (Regilait, França) durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante. De seguida, lavou-se a membrana e incubou-se durante a noite a 4°C com cada um dos anticorpos primários *rabbit anti-mouse* CYP1B1 (Santa Cruz Biothecnology), CYP2C11 (Abcam) e CYP3A9 (Santa Cruz Biothecnology), diluídos 1:500 em TBS- T. Posteriormente, lavou-se 3x15 minutos com TBS-T e incubou-se a membrana com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* (H+L, Molecular Probes), diluído de 1:1000 em TBS-T durante 1 hora e 20 minutos à temperatura ambiente, com agitação constante. As membranas foram lavadas 3x10 minutos com TBS-T e a revelação

foi realizada com 200  $\mu$ L do substrato ECF (Western Blotting Reagent Packs, Amersham). A fluorescência foi detetada no sistema Molecular Imager FX Pro Plus Multilmager (Biorad).

## 10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), tendo sido avaliada através dos testes ANOVA (teste de Bonferroni), e *t-student*. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Diferenças com  $p < 0.05$  foram consideradas estatisticamente significativas.



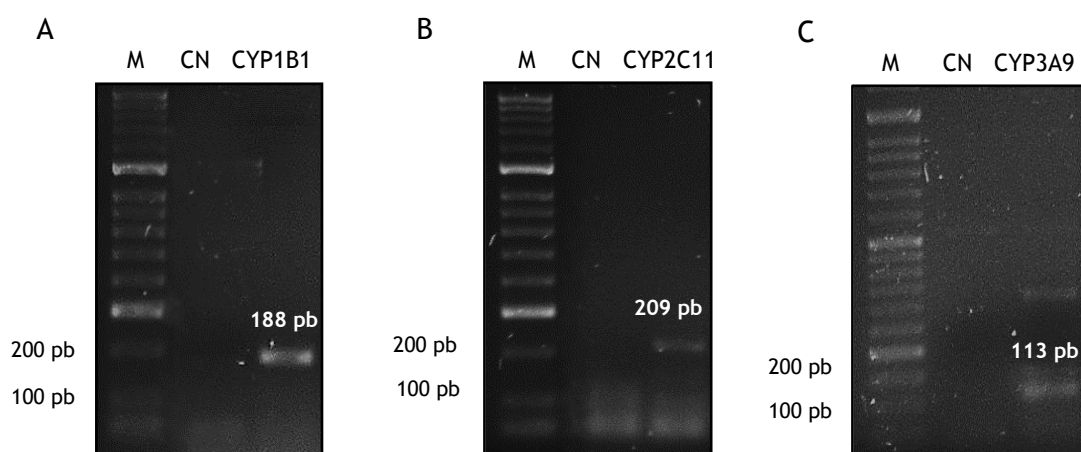
## IV. Resultados

### 1. Presença de enzimas do metabolismo dos xenobióticos no plexo coróide de rato

#### 1.1. Análise da expressão dos genes CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9

A expressão de mRNA das enzimas do metabolismo de xenobióticos CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 foi comprovada através da técnica de RT-PCR. Esta técnica permitiu a amplificação das sequências de nucleótidos correspondentes aos genes em causa, por meio da transcrição reversa de mRNA em cDNA e posterior PCR de cada gene com *primers* específicos. Os produtos da amplificação resultantes foram visualizados por eletroforese em gel de agarose com *Green Safe Premium*, analisando-se o tamanho de cada um dos fragmentos obtidos por comparação com as bandas obtidas com o marcador de peso molecular HiperLadder II (Bioline).

Na Figura 9, estão representados o marcador (M), o controlo negativo (CN) em paralelo com o fragmento de PCR de cada gene em análise. Em nenhum dos controlos negativos foi observada amplificação, o que indicou ausência de contaminação com DNA exógeno.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos de RT-PCR para o estudo da expressão de mRNA das enzimas do metabolismo dos xenobióticos no plexo coróide de rato.

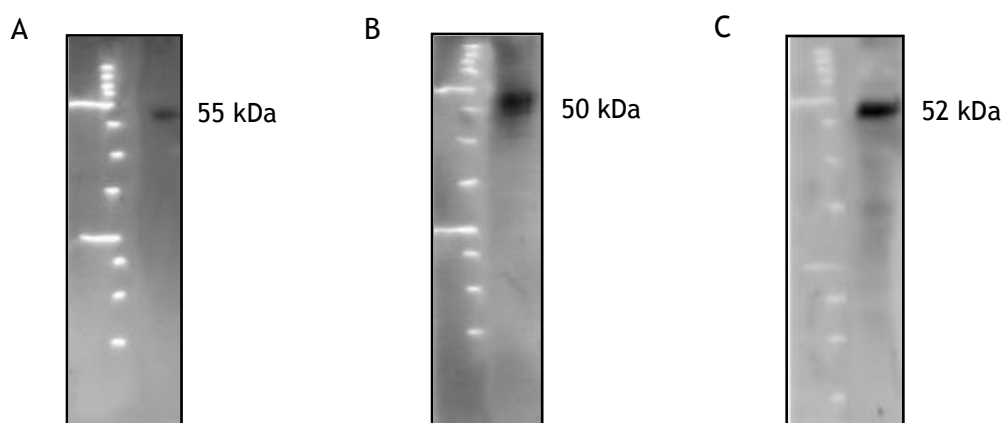
Em cada uma das imagens encontra-se representado (da esquerda para a direita) o marcador (M), o controlo negativo (CN) e o fragmento do gene em causa CYP1B1 (A) com 188 pb, CYP2C11 (B) com 209 pb e CYP3A9 (C) com 113 pb.

O fragmento da figura 9A corresponde ao gene CYP1B1, com um tamanho de 188 pb; o fragmento da figura 9B corresponde ao gene CYP2C11, com um tamanho de 209 pb e o fragmento da figura 9C corresponde ao gene CYP3A9, com um tamanho de 113 pb.

Os produtos amplificados foram sequenciados e os resultados foram analisados no programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmando, por comparação com a base de dados, a identidade das sequências de mRNA correspondentes aos genes em análise. Após alinhamento das sequências amplificadas com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*, obteve-se uma homologia superior a 96% para todas as sequências nucleotídicas. Deste modo, confirmou-se a presença de mRNA dos genes do metabolismo dos xenobióticos em análise, CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9, em CP de rato.

### 1.2. Análise da expressão das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9

A análise da expressão das proteínas em estudo foi realizada pela técnica de Western Blot, a partir de extratos de proteína total de CP, tendo sido incubados com os respectivos anticorpos primários. Esta técnica demonstrou a presença das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em CP de rato, apresentando uma banda com 55 kDa, 50 kDa e 52 kDa respectivamente, comparando com o NZYColour Protein Marker II (Figura 10).



**Figura 10.** Western blot realizados a partir de extratos de proteína total de plexo coróide de rato. Incubação com anticorpos CYP1B1 (A) com um peso molecular de 55 kDa, CYP2C11 (B) com peso molecular de 50 kDa e CYP3A9 (C) com um peso molecular de 52 kDa.

### 1.3. Localização das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 no plexo coróide de rato

A técnica de imunofluorescência em Whole-Mount permitiu identificar a presença das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em tecido, nomeadamente no CP de rato. Os CPs foram incubados com os respetivos anticorpos primários e, posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que se liga ao anticorpo primário, emitindo fluorescência no comprimento de onda do verde. Para além disso, todos os CPs foram incubados com DAPI, que emite fluorescência no comprimento de onda do azul, para marcação dos núcleos. Para confirmar a especificidade e a inexistência de autofluorescência das células, fez-se um controlo negativo sem anticorpo primário e, um outro controlo negativo onde não houve incubação nem com anticorpo primário, nem com anticorpo secundário.

Utilizando um microscópio confocal, observou-se a localização citoplasmática das proteínas CYP1B1 (Figura 11A), CYP2C11 (Figura 11B) e CYP3A9 (Figura 11C) em explantes de CP de rato. Nos controlos negativos, não se verificou qualquer marcação (Figura 11D).

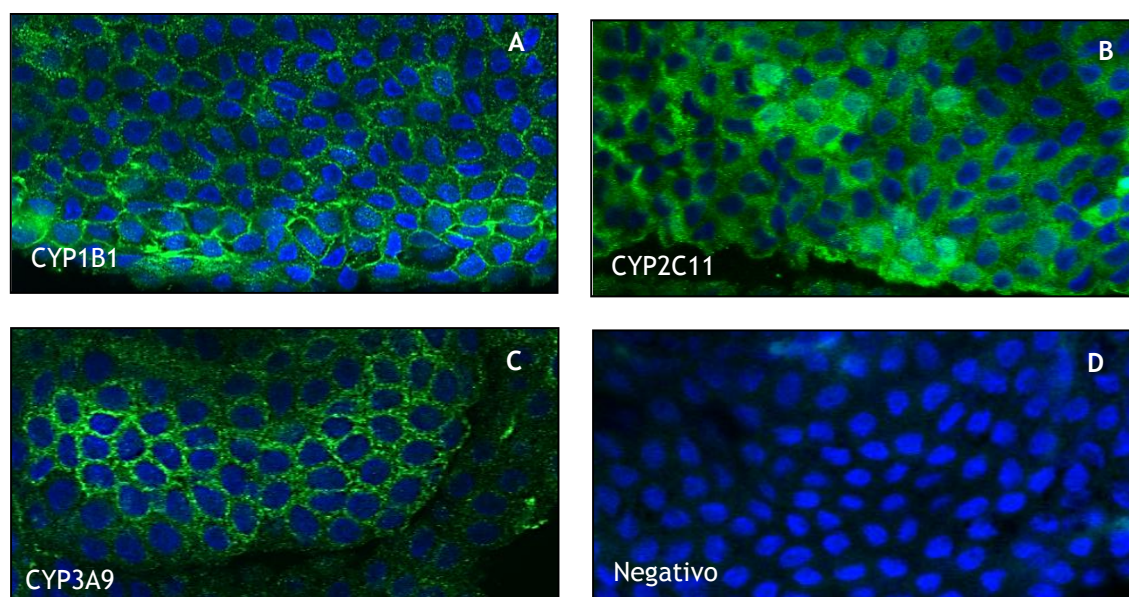


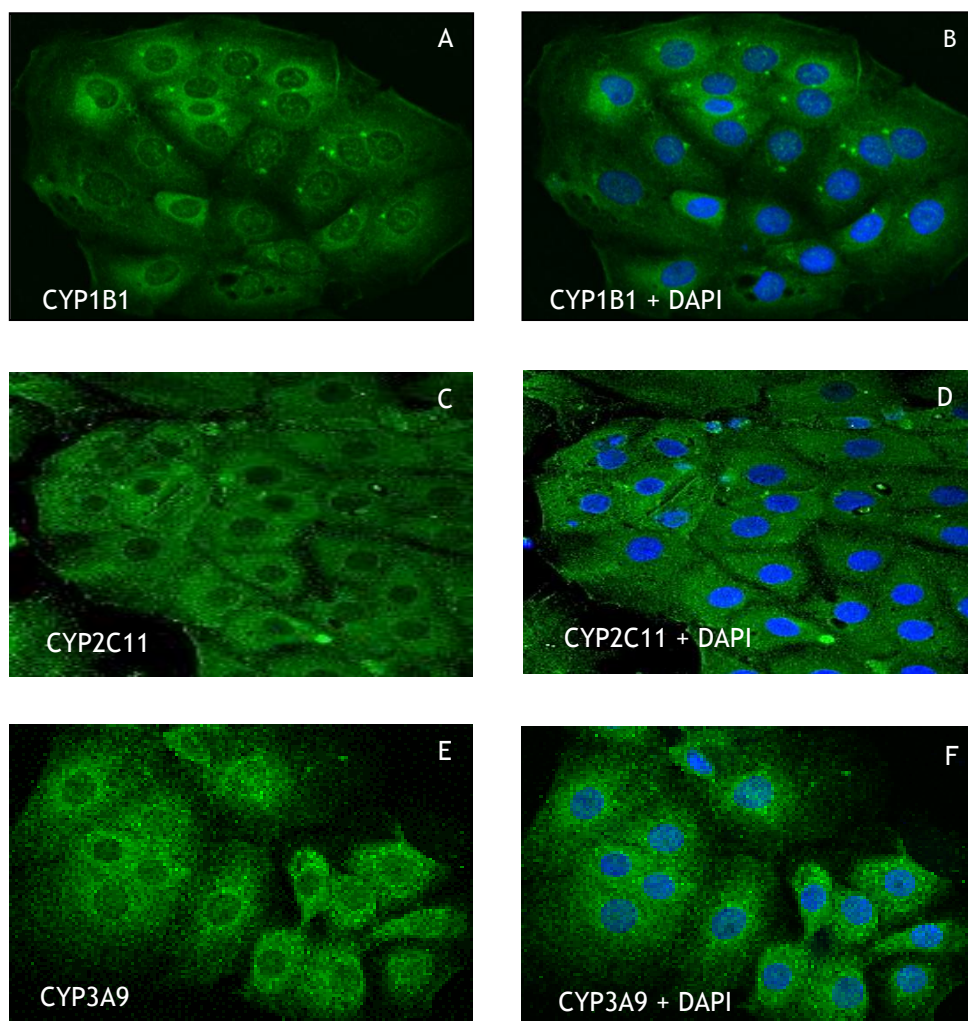
Figura 11. Imunofluorescência das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em explantes de plexo coróide de rato.

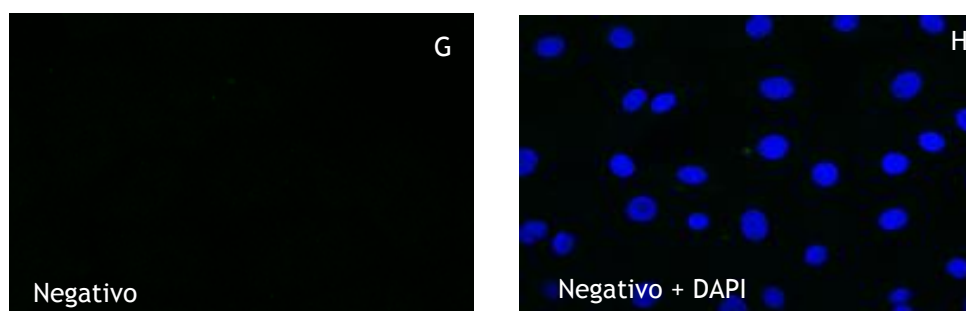
Imagens representativas de CPs de rato incubados com anticorpos primários para CYP1B1 (A), CYP2C11 (B) e CYP3A9 (C), e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI. A imagem D representa o controlo negativo, em que há a omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas numa ampliação de 63x.

### 1.4. Localização das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em células epiteliais de plexo coróide de rato

A técnica de imunocitoquímica por fluorescência permitiu identificar a presença das proteínas em estudo, em culturas primárias de CP de rato. Nesta técnica, à semelhança do procedimento em *whole-mount*, as CPEC foram marcadas com anticorpos primários específicos para CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 e, posteriormente incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488. De seguida, as CPEC foram incubadas com DAPI para marcação do núcleo.

Após visualização das lâminas no microscópio confocal, confirmou-se novamente a presença das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 no citoplasma das células epiteliais de CP (Figura 12A, B, C, D, E e F). Nos controlos negativos não se verificou qualquer marcação como se pode observar nas imagens apresentadas (Figura 12G e H).





**Figura 12.** Imunofluorescência das proteínas CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato.

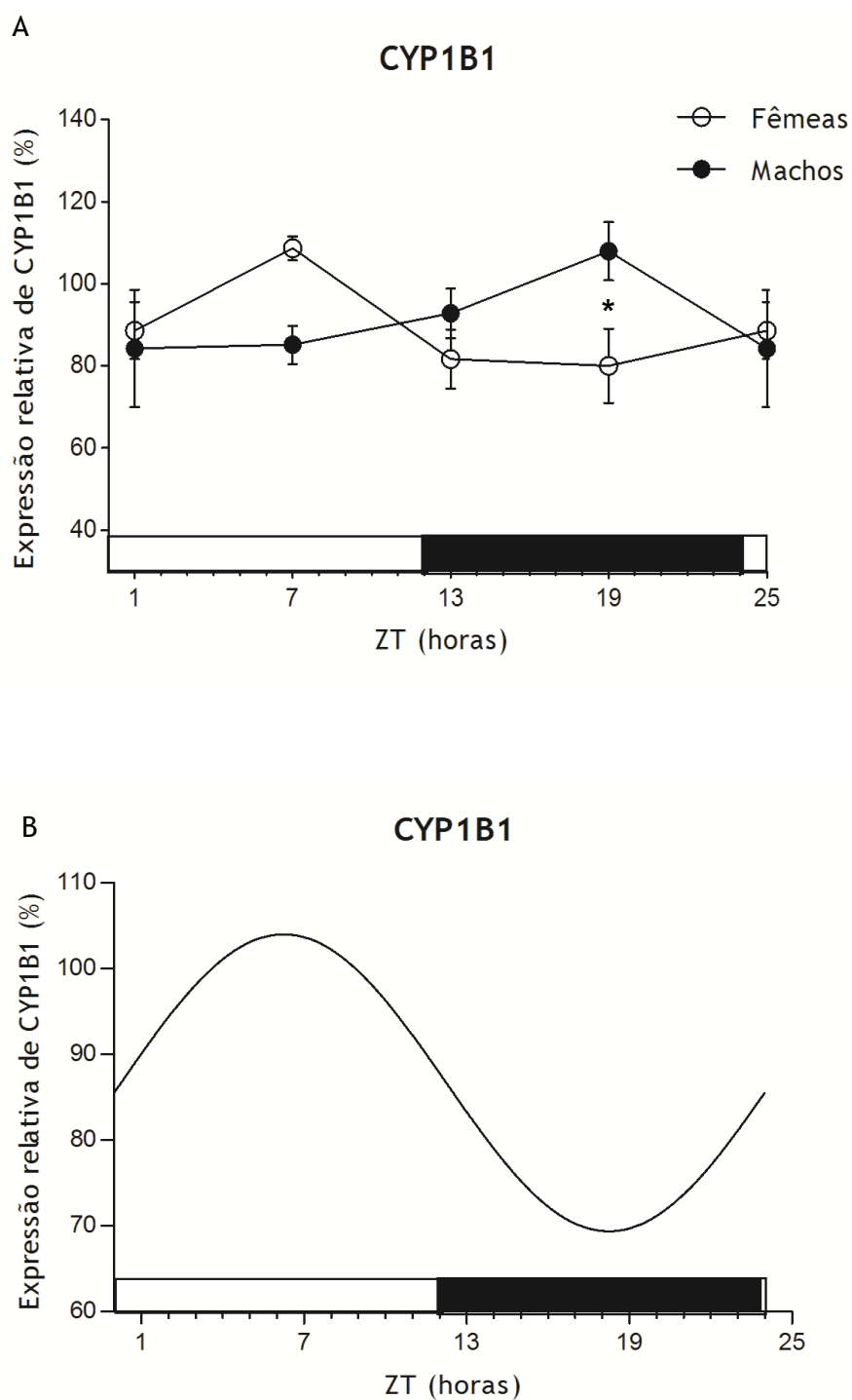
Imagens representativas de CPEC de rato incubadas com anticorpos primários para CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI. A primeira coluna mostra a marcação com o anticorpo primário específico (A, C e E); a segunda coluna apresenta a marcação com anticorpo primário em conjunto com a marcação dos núcleos com DAPI (B, D e F). As imagens G e H representam o controle negativo, em que há a omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas numa ampliação de 63x.

## 2. Expressão circadiana da enzima CYP1B1 no plexo coróide de rato

### 2.1. Análise da oscilação circadiana de CYP1B1

Com o objetivo de estudar a regulação da enzima CYP1B1 pelo ritmo circadiano, analisou-se a expressão de mRNA de CYP1B1 em CPs de rato recolhidos a diferentes ZTs, pela técnica de PCR em tempo real. Cada grupo de animais em estudo era constituído por 6 ratos fêmea e 6 ratos macho, para se poder comparar as diferenças de expressão de CYP1B1, entre géneros e a diferentes ZTs (ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19). Para normalização dos níveis de expressão de CYP1B1, utilizou-se o gene da Ciclofilina A como controlo endógeno.

Os níveis de mRNA de CYP1B1 variam ao longo do dia nas fêmeas, sendo maior a expressão deste CYP na presença de luz, verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre ZT7 e ZT19 ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, os machos não revelaram alterações nos níveis de expressão de CYP1B1, mantendo-se relativamente constantes ao longo de 24 horas (Figura 13A). A Figura 13B representa a análise dos resultados utilizando o CircWave (<http://www.euclock.org/results/item/circ-wave.html>), um *software* específico para a análise do ritmo circadiano. Verificando-se, de acordo com a análise anterior, significado estatístico apenas nas fêmeas ( $p < 0.05$ ).



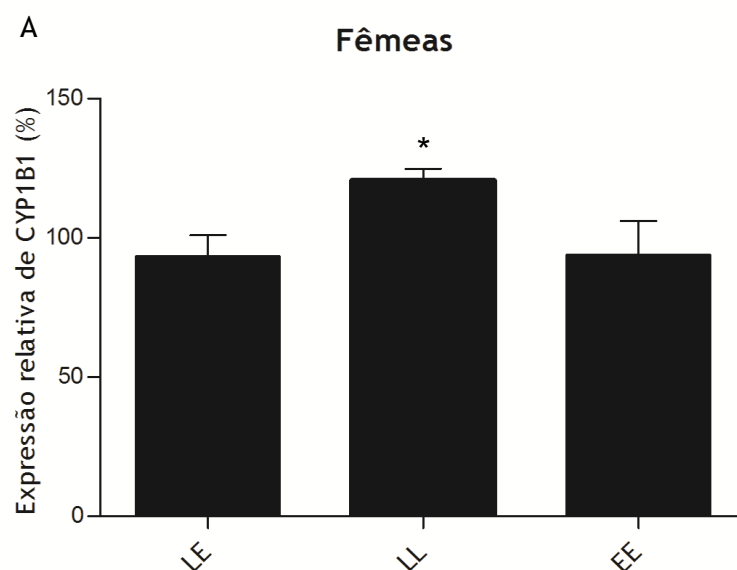
**Figura 13. Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 ao longo do dia, no plexo coróide de rato.**

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa, respectivamente, as 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Cada ponto representa a média  $\pm$  SEM (n= 4-5). O ponto correspondente ao ZT25 é uma sobreposição do ponto correspondente ao ZT1. As oscilações circadianas foram analisadas recorrendo ao (A) ANOVA, teste Bonferroni (GraphPad) e (B) software CircWave. \* diferença estatisticamente significativa entre ZT7 e ZT19 em fêmeas ( $p < 0.05$ ).

## 2.2. Análise da interrupção circadiana na expressão da enzima CYP1B1

A expressão de mRNA de CYP1B1 no CP foi analisada entre ratos fêmea e macho, após interrupção do ritmo circadiano, nomeadamente após exposição prolongada (3 dias) a LL ou EE. A análise dos resultados foi baseada nas diferenças de expressão entre o nosso grupo de estudo (LL ou EE) comparativamente a um grupo controlo constituído por fêmeas e machos expostos a um fotoperíodo normal (12 horas luz: 12 horas escuro). Cada grupo de animais em estudo era constituído por 8 ratos fêmea e 8 ratos macho, para análise das diferenças entre géneros.

Os níveis de expressão de CYP1B1 após interrupção do ritmo circadiano em fêmeas aumentou nos animais expostos a 3 dias de LL, comparativamente com as fêmeas que foram submetidas a fotoperíodo normal ( $p < 0.05$ ). Nas fêmeas expostas a 3 dias de EE, não se verificaram diferenças significativas (Figura 14A). Relativamente aos machos, não apresentaram qualquer diferença estatisticamente significativa, nas 2 condições em estudo (Figura 14B).



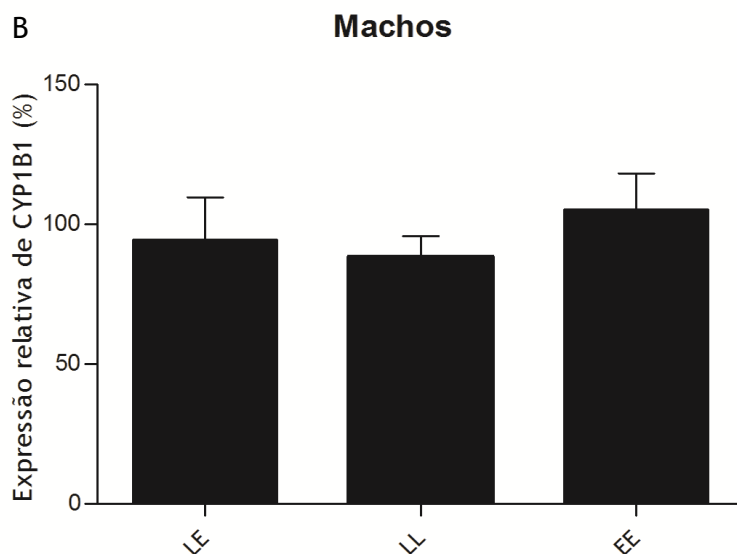


Figura 14. Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 após interrupção circadiana, no plexo coróide de rato.

Cada barra representa a média  $\pm$  SEM (n=5-8). Nas fêmeas (A) houve um aumento de expressão de CYP1B1 no caso de exposição a luz constante, relativamente ao controlo. No entanto, a expressão de CYP1B1 nos machos após interrupção do ritmo circadiano (B), não se alterou significativamente. \*diferença estatisticamente significativa entre LE e LL em fêmeas ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados através do programa GraphPad (teste *t-student*); LE - Luz/Escuridão, LL- Luz/Luz e EE - Escuridão/Escuridão.

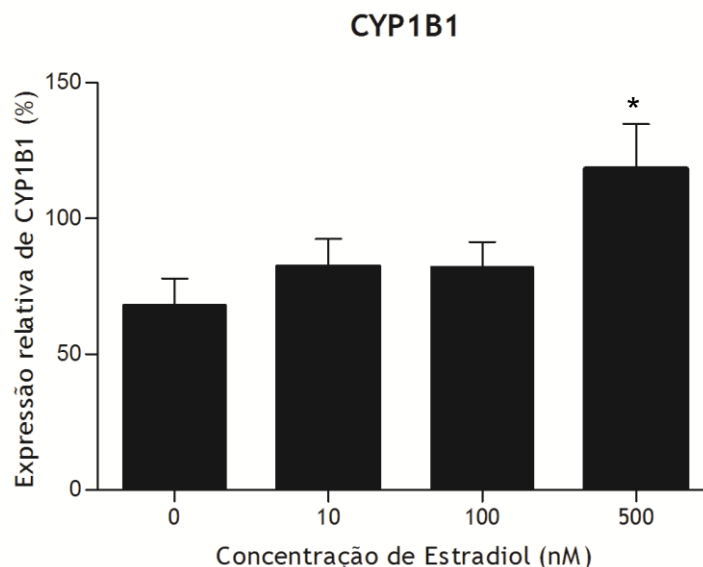
### 3.Regulação dos níveis de CYP1B1 em células epiteliais de plexo coróide de rato

#### 3.1. Efeito do estradiol na expressão do gene CYP1B1

Sendo o 17 $\beta$ - estradiol ( $E_2$ ) e o recetor de estrogénio (ER), um substrato e um ligando respetivamente para a enzima CYP1B1, analisou-se o efeito do  $E_2$  nos níveis de expressão génica deste CYP.

A expressão de mRNA de CYP1B1, após um estímulo de 24 horas com diferentes concentrações de  $E_2$  (0 nM, 10 nM, 100 nM e 500 nM), foi analisada por PCR em tempo real em culturas primárias de CPEC de rato. Os níveis de expressão foram comparados entre os diferentes grupos em estudo.

Verificou-se um aumento de expressão de CYP1B1 nas CPEC tratadas com 500nM comparativamente com o controlo (0nM;  $p < 0.05$ ). Não se verificou qualquer diferença na expressão de CYP1B1 quando se estimularam as CPEC com 10 ou 100nM. (Figura 15).



**Figura 15.** Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato, após estímulo com diferentes concentrações de estradiol (0 nM, 10 nM, 100 nM e 500 nM) durante 24 horas.

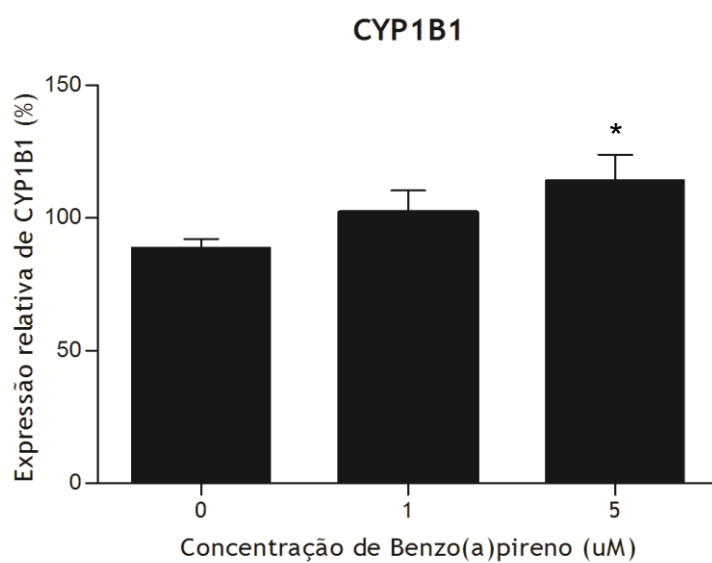
Cada barra representa a média  $\pm$  SEM (n=8-14). \* diferença estatisticamente significativa entre o grupo não tratado (0 nM) e o grupo tratado (500 nM) ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados através do programa GraphPad (ANOVA, teste Bonferroni).

### 3.2. Efeito do Benzo(a)pireno na expressão do gene CYP1B1

O CYP1B1 é tipicamente induzido pela ativação do AhR, através da ligação de tóxicos ambientais como o BaP. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do BaP nos níveis de expressão de CYP1B1 em culturas primárias de CPEC.

A análise da expressão de mRNA de CYP1B1 após um estímulo de 6 horas com diferentes concentrações de BaP (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M) foi analisada por PCR em tempo real. Os níveis de expressão foram comparados entre os diferentes grupos em estudo.

Verificou-se um aumento de expressão de CYP1B1 nas CPEC tratadas com 5  $\mu$ M comparativamente com o grupo controlo (0  $\mu$ M;  $p < 0.05$ ). Não se verificou qualquer diferença na expressão de CYP1B1 quando se estimularam as CPEC com 1  $\mu$ M. (Figura 16).



**Figura 16.** Expressão relativa de mRNA do gene CYP1B1 em culturas primárias de células epiteliais de plexo coróide de rato, após estímulo com diferentes concentrações de benzo(a)pireno (0 μM, 1 μM e 5 μM) durante 6 horas.

Cada barra representa a média ± SEM (n=5-8). \* diferença estatisticamente significativa entre o grupo não tratado (0 μM) e o grupo tratado (5 μM) ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados através do programa GraphPad (teste *t-student*).

## V. Discussão

Um estudo de *microarrays* de cDNA realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, identificou um conjunto de genes associados à metabolização de xenobióticos no CP de ratos fêmea e macho (Quintela *et al.*, 2013). Neste estudo ficou demonstrado que genes da via do ritmo circadiano eram diferencialmente expressos neste tecido (Quintela *et al.*, 2013), pressupondo que o CP poderia ser mais um oscilador circadiano presente no CNS.

No CP já foram identificadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, entre as quais enzimas de fase I-III para funcionalização, conjugação e transporte de fármacos (Emerich *et al.*, 2005). Juntamente com a barreira hemato-encefálica, o CP, constituindo a barreira sangue-CSF, é importante na homeostasia do CNS devido ao seu sistema único de desintoxicação (Choudhuri *et al.*, 2003; Mortazavi *et al.*, 2014).

O fígado, o intestino e o rim, tal como o CP, também são sistemas de desintoxicação importantes. Análises do transcriptoma de fígado revelaram que proteínas de desintoxicação de fase I-III eram expressas de forma circadiana, e que este tecido estava sujeito à sincronização por parte do SCN e de osciladores periféricos (Claudel *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 2007). Alterações na expressão destas proteínas podem influenciar por exemplo, o metabolismo de fármacos, afetando a sua eficácia terapêutica e toxicidade no tratamento clínico de cancro, doenças cardiovasculares, infeções bacterianas, inflamação, entre outros (Baraldo, 2008).

Uma vez que o CP poderá funcionar como um oscilador circadiano, os níveis de expressão das enzimas metabolizadoras de xenobióticos nesta estrutura poderão variar ao longo do dia. Com o objetivo de explorar a possibilidade do ritmo circadiano afetar o metabolismo dos xenobióticos, por alteração da expressão dos genes envolvidos, este trabalho focou-se no estudo da expressão circadiana de CYPs envolvidos no metabolismo de xenobióticos no CP.

As enzimas CYP são enzimas de fase I envolvidas na ativação/inativação oxidativa de compostos endógenos e exógenos, como fármacos, toxinas ambientais e substâncias naturais (Miksys e Tyndale, 2002). Entre as várias enzimas CYP, apenas as famílias 1, 2 e 3 estão envolvidas na metabolização de xenobióticos. Com base nos resultados obtidos no nosso estudo prévio dos *microarrays*, selecionaram-se os genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos que apresentavam uma maior expressão no CP, o CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9, de modo a investigar a sua expressão circadiana em ratos fêmea e macho.

A verificação da expressão destes genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos em CP de rato foi realizada por RT-PCR. A análise da expressão das proteínas em estudo foi efetuada

por Western blot. Os resultados obtidos por Western Blot mostram uma banda com 55 kDa para a proteína CYP1B1, que está de acordo com o descrito na literatura por Jacob *et al.* para CP de rato (Jacob *et al.*, 2011). A expressão proteica de CYP2C11 em CP de rato apresenta 50 kDa, sendo que no fígado e hemisférios cerebrais exibe um peso molecular de 50 kDa e 55 kDa, respectivamente (Weerasinghe *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2014). Relativamente à proteína CYP3A encontra-se expressa no fígado e no intestino, apresentando um peso molecular de 52-55 kDa (Fujita *et al.*, 2008). No CP foi identificada uma banda com cerca de 52 kDa, correspondente ao CYP3A9.

As proteínas metabolizadoras de xenobióticos foram também analisadas pelas técnicas de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* e imunocitoquímica por fluorescência, de modo a observar a distribuição e localização das proteínas no CP. Pode observar-se que as proteínas CYP em estudo se encontram, sobretudo localizadas no citoplasma das CPEC.

De acordo com a literatura, a proteína CYP1B1 nos humanos pode ser nuclear e/ou citoplasmática, dependendo do tecido em análise. Em órgãos como o ovário, o cérvix e o cérebro, a CYP1B1 encontra-se principalmente no núcleo celular. No caso do rim e tecido mamário, esta proteína é identificada tanto no núcleo como no citoplasma (Muskhelishvili *et al.*, 2001). A CYP1B1 é expressa principalmente em tecidos extra-hepáticos, sendo identificada em tecidos normais e sobre expressa em alguns carcinomas (Sissung *et al.*, 2006). A proteína CYP2C11 é encontrada em tecidos como o fígado, o rim e o cérebro (Roman, 2002). Estudos anteriores revelaram a elevada expressão desta enzima em astrócitos (Alkayed *et al.*, 2002), bem como no citoplasma de hepatócitos (Mori *et al.*, 2007). No que diz respeito à sua distribuição tecidual, a proteína CYP3A9 é expressa em vários tecidos, nomeadamente no fígado, pulmão, rim e cérebro (Anakk *et al.*, 2003).

De forma a avaliar a ritmicidade circadiana do gene CYP1B1 em CP de ratos fêmea e macho, o padrão de expressão destes genes foi analisado, por PCR em tempo real, a diferentes horas do dia (08:00, 14:00, 20:00 e 02:00 horas). A expressão de mRNA do CYP1B1 não apresentou oscilações circadianas em ratos macho, mantendo-se praticamente constante ao longo do dia. Contrariamente, os níveis de mRNA de CYP1B1 em fêmeas mostraram oscilações ao longo do ciclo circadiano, ocorrendo um pico máximo e mínimo de expressão às 8:00 e às 20:00 horas, respetivamente. Estas diferenças observadas são estatisticamente significativas e estes resultados indicam que o CP exibe um ritmo circadiano na expressão de CYP1B1.

As oscilações circadianas na expressão do gene CYP1A1, outro citocromo pertencente à família 1, já foram analisadas no SCN e em outros tecidos. No SCN a expressão do CYP1A1 apresenta um padrão rítmico, no qual aumentam os níveis de mRNA durante a noite e diminuem durante o dia. No fígado, este gene tem o pico mínimo às 16 horas e o pico máximo às 20 horas (Mukai *et al.*, 2008). No pulmão, o CYP1A1 apresenta também uma oscilação

rítmica, com o seu nível de expressão máximo às 21 horas e o mínimo às 13 horas (Tanimura *et al.*, 2011), contrariamente ao observado no nosso estudo.

No seguimento do estudo anterior, avaliou-se se a disrupção do ritmo circadiano poderia alterar a expressão do gene CYP1B1, em fêmeas e machos. Para isso, um grupo de ratos foi exposto a condições de EE, e um outro grupo exposto a condições de LL. A análise dos resultados baseou-se nas diferenças de expressão entre o grupo exposto às condições descritas anteriormente e o grupo controlo, exposto a um fotoperíodo normal (12 horas luz: 12 horas escuro).

Verificou-se que a exposição a EE não afetou a expressão do gene CYP1B1 em fêmeas e machos. No entanto, nas fêmeas expostas a LL observou-se um aumento na expressão do gene CYP1B1. Pelo contrário, a expressão de CYP1B1 nos machos não sofreu alteração.

Devido à relevância do ciclo de luz/escuridão na sincronização temporal de um organismo, variações na exposição à luz podem alterar a ritmicidade circadiana interna. Estudos com modelos animais demonstraram alterações no comportamento e fisiologia, bem como nos mecanismos moleculares do relógio, aquando uma disrupção circadiana (Salgado-Delgado *et al.*, 2011).

O mecanismo do relógio molecular é baseado numa rede de *loops* de feedback de transcrição e tradução. A forma como estes *loops* estão interligados pode ser muito específica, podendo até mudar sob determinadas condições, tal como LL versus EE (Roenneberg e Merrow, 2003). É possível que a exposição à luz durante a noite gere efeitos nocivos sobre os animais, através da perturbação das funções do relógio biológico (Ohta *et al.*, 2005).

Em roedores, a exposição a luz constante leva à irritabilidade, ansiedade, bem como comportamentos depressivos e alterações na aprendizagem e memória. O envelhecimento acelerado, a propensão à obesidade e o desenvolvimento de tumores são outras consequências da exposição persistente à luz (Salgado-Delgado *et al.*, 2011).

As diferenças observadas entre fêmeas e machos no nosso estudo colocam em evidência uma possível regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas, aquando de uma disrupção, evidenciando o possível papel do estradiol aquando uma alteração fisiológica. No entanto, ainda não está totalmente clarificado de que forma os estrogénios e os seus recetores alteram a expressão do recetor AhR e subsequentemente expressão de genes CYP1 (Monostory e Dvorak, 2011).

Foi também analisado o efeito de dois substratos do CYP1B1, o E<sub>2</sub> e o BaP, na expressão do gene por PCR em tempo real. Este esteroide e xenobiótico são dois exemplos de substâncias metabolizadas pelo CYP1B1. Para tal, as CPEC foram estimuladas com diferentes

concentrações (0, 10, 100 e 500nM) de E<sub>2</sub> e (0, 1 e 5 μM) de BaP, durante 24 e 6 horas, respectivamente.

A incubação das CPEC com E<sub>2</sub> aumentou a expressão de CYP1B1 de forma gradual, obtendo-se diferenças significativas para a concentração de 500nM. Tsuchiya *et al.* demonstrou que o E<sub>2</sub> induz a expressão de mRNA de CYP1B1 em células ER-positivas, em que há a interação direta entre o ERα e elementos presentes na sequência de CYP1B1 (Tsuchiya *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos pelos quais os estrogênios e o ER modificam a expressão de AhR e, conseqüentemente os genes CYP1, ainda não foram clarificados. O resultado obtido do estímulo com E<sub>2</sub> é corroborado por outros estudos que nos indicam o papel do estradiol na expressão desta enzima. A linha celular MCF-7 incubada com 10nM de E<sub>2</sub> durante 12 horas demonstrou um aumento de cerca de 3 vezes na expressão de CYP1B1 (Tsuchiya *et al.*, 2004). Para além disso, num estudo em que se procedeu à ovariectomia de ratos fêmea e posterior tratamento com estradiol, verificou-se o aumento da expressão das enzimas xenobióticas CYP1A1 e CYP1B1 em células uterinas (Rataj *et al.*, 2012), fundamentando a importância do estradiol na regulação da expressão de CYP1B1.

O mesmo aumento de expressão gradual de CYP1B1 se verificou com a incubação das CPEC com BaP, obtendo-se diferenças significativas para a concentração de 5 μM. Estudos anteriores indicam também a regulação de CYP1B1 por BaP, nomeadamente em linhas celulares de pulmão, um órgão largamente exposto a substâncias tóxicas presentes no fumo do tabaco. A exposição de 3 μM de BaP durante 24 horas resultou numa expressão 12 a 20 vezes superior de CYP1B1, na linha celular BEP2D de pulmão (Uppstad *et al.*, 2010). Em tecido de fígado e pulmão incubados com BaP com concentrações de 1 μM, 10 μM e 80 μM, também se verificou um aumento da expressão de CYP1B1 proporcional com a concentração de BaP (Harrigan *et al.*, 2006). Para além disso, o CYP1B1 também demonstrou estar sobre expresso em células epiteliais de tecido mamário humano exposto a BaP, bem como nas linhas celular MCF-7 e HepG2 (Hockley *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o papel do relógio circadiano na regulação da expressão de enzimas metabolizadoras de xenobióticos no CP. Dado que se observa esta modulação especificamente nas fêmeas, estudos para clarificar de que forma o E<sub>2</sub> altera a expressão do AhR e subseqüentemente a expressão de genes CYP1, seriam importantes para a compreensão desta regulação.

## VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho experimental provou-se a existência de mRNA do CYP1B1, CYP2C11 e CYP3A9 em CP de rato, assim como a presença e a localização das respetivas enzimas no citoplasma das CPEC de rato. Para corroborar estes resultados, deveriam ser efetuados estudos de imunocitoquímica com co-marcação do retículo endoplasmático e da mitocôndria para uma localização mais precisa das enzimas xenobióticas nas CPEC de rato.

Verificou-se também o papel do relógio circadiano na regulação da expressão do gene CYP1B1. Em CP de rato, o gene CYP1B1 demonstrou oscilações circadianas na sua expressão. Após a disrupção do ritmo circadiano por exposição a luz/escuridão constante, as alterações na expressão de CYP1B1 revelaram a importância deste ZT (luz) nos mecanismos envolventes na expressão desta enzima. Foram demonstradas alterações na expressão de CYP1B1 apenas em ratos fêmea, o que elucidou o possível papel dos estrogénios na regulação da expressão de CYP1B1. Estudos *in vivo* utilizando um grupo de ratos fêmea gonadetomizadas, um grupo de ratos fêmea gonadetomizadas em terapia de substituição hormonal e um grupo controlo, serão importantes para confirmar o possível papel do E<sub>2</sub> na regulação da expressão de CYP1B1.

Os resultados obtidos após estimulação das CPEC com E<sub>2</sub> e BaP revelaram que o CP poderá ter a capacidade de metabolizar substâncias endógenas e exógenas, tal como o fígado. Para complementar estes resultados, será necessário realizar ensaios de MTT para comprovar a viabilidade celular das CPEC após estimulação.

Para complementar os resultados da estimulação *in vitro* com E<sub>2</sub> e BaP, poderão futuramente ser feitos ensaios *in vivo*, comparando a expressão do gene CYP1B1 entre um grupo de ratos sem tratamento (controlo) e um grupo de ratos tratados com E<sub>2</sub> ou BaP. Este ensaio teria como objetivo analisar a variação da expressão desta enzima ao longo do dia, podendo ser uma ajuda na compreensão do papel desta enzima metabolizadora no CP.

Futuramente, seria interessante estudar também se há alterações na composição do CSF após metabolização de xenobióticos pelo CP e, de que forma isso afetarà a homeostase do CNS.



## VII. Referências Bibliográficas

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

Alkayed, N. J., T. Goyagi, H. D. Joh, J. Klaus, D. R. Harder, R. J. Traystman and P. D. Hurn (2002). "Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack." Stroke **33**(6): 1677-1684.

Anakk, S., C. Y. Ku, M. Vore and H. W. Strobel (2003). "Insights into gender bias: rat cytochrome P450 3A9." J Pharmacol Exp Ther **305**(2): 703-709.

Baraldo, M. (2008). "The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans." Bauer, B., J. Schlichtiger, A. Pekcec and A. M. S. Hartz (2011). Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy, Intech.

Brodbelt, A. and M. Stoodley (2007). "CSF pathways: a review." Br J Neurosurg **21**(5): 510-520.

Bruguerolle, B., A. Boulamery and N. Simon (2008). "Biological rhythms: a neglected factor of variability in pharmacokinetic studies." Journal of pharmaceutical sciences **97**(3): 1099-1108.

Bruno, R. D. and V. C. Njar (2007). "Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development." Bioorg Med Chem **15**(15): 5047-5060.

Chikly, B. and J. Quaghebeur (2013). "Reassessing cerebrospinal fluid (CSF) hydrodynamics: a literature review presenting a novel hypothesis for CSF physiology." J Bodyw Mov Ther **17**(3): 344-354.

Chodobski, A. and J. Szmydynger-Chodobska (2001). "Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis." Microsc Res Tech **52**(1): 65-82.

Choudhuri, S., N. J. Cherrington, N. Li and C. D. Klaassen (2003). "Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats." Drug Metab Dispos **31**(11): 1337-1345.

Chun, Y. J. and S. Kim (2003). "Discovery of cytochrome P450 1B1 inhibitors as new promising anti-cancer agents." Med Res Rev **23**(6): 657-668.

Claudel, T., G. Cretenet, A. Saumet and F. Gachon (2007). "Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock." FEBS letters **581**(19): 3626-3633.

de Lange, E. (2004). "Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier." Advanced drug delivery reviews **56**(12): 1793-1809.

Denisov, I. G., T. M. Makris, S. G. Sligar and I. Schlichting (2005). "Structure and chemistry of cytochrome P450." Chem Rev **105**(6): 2253-2277.

Dibner, C., U. Schibler and U. Albrecht (2010). "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks." Annu Rev Physiol **72**: 517-549.

Dragunow, M. (2013). "Meningeal and choroid plexus cells--novel drug targets for CNS disorders." Brain Res **1501**: 32-55.

Dutheil, F., P. Beaune and M. A. Lorient (2008). "Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain." Biochimie **90**(3): 426-436.

Emerich, D. F., S. J. Skinner, C. V. Borlongan, A. V. Vasconcellos and C. G. Thanos (2005). "The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain." Bioessays **27**(3): 262-274.

Emerich, D. F., A. V. Vasconcellos, R. B. Elliott, S. J. Skinner and C. V. Borlongan (2004). "The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation." Expert Opin Biol Ther **4**(8): 1191-1201.

Fujita, T., S. Yasuda, Y. Kamata, K. Fujita, Y. Ohtani, Y. Kumagai and M. Majima (2008). "Contribution of down-regulation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A to increased absorption of cyclosporine A in a rat nephrosis model." J Pharmacol Exp Ther **327**(2): 592-599.

Gachon, F. and D. Firsov (2011). "The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification." Expert opinion on drug metabolism & toxicology **7**(2): 147-158.

Gachon, F., E. Nagoshi, S. A. Brown, J. Ripperger and U. Schibler (2004). "The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology." Chromosoma **113**(3): 103-112.

Gachon, F., F. F. Olela, O. Schaad, P. Descombes and U. Schibler (2006). "The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification." Cell metabolism **4**(1): 25-36.

Gajjar, K., P. L. Martin-Hirsch and F. L. Martin (2012). "CYP1B1 and hormone-induced cancer." Cancer Lett **324**(1): 13-30.

Ghersi-Egea, J. F. and N. Strazielle (2001). "Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 83-88.

Gibson, G. G. and P. Skett (2001). Introduction to drug metabolism. Cheltenham, UK, Nelson Thornes Publishers.

Gonzalez, F. J. (2003). "Role of gene knockout and transgenic mice in the study of xenobiotic metabolism." Drug Metab Rev **35**(4): 319-335.

Guengerich, F. P. (2001). "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity." Chem Res Toxicol **14**(6): 611-650.

Guengerich, F. P. (2003). "Cytochromes P450, drugs, and diseases." Mol Interv **3**(4): 194-204.

Guilding, C. and H. D. Piggins (2007). "Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?" Eur J Neurosci **25**(11): 3195-3216.

Haduch, A., J. Wojcikowski and W. A. Daniel (2011). "Effect of neuroleptics on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver." Pharmacol Rep **63**(6): 1491-1499.

Harrigan, J. A., B. P. McGarrigle, T. R. Sutter and J. R. Olson (2006). "Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene." Toxicol In Vitro **20**(4): 426-438.

Hastings, M., J. S. O'Neill and E. S. Maywood (2007). "Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms." Journal of Endocrinology **195**(2): 187-198.

Hockley, S. L., V. M. Arlt, D. Brewer, I. Giddings and D. H. Phillips (2006). "Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo(a)pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2." BMC Genomics **7**: 260.

- Jacob, A., A. M. Hartz, S. Potin, X. Coumoul, S. Yousif, J. M. Scherrmann, B. Bauer and X. Declèves (2011). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent upregulation of Cyp1b1 by TCDD and diesel exhaust particles in rat brain microvessels." Fluids Barriers CNS **8**: 23.
- Jan, Y. H., V. Mishin, C. M. Busch and P. E. Thomas (2006). "Generation of specific antibodies and their use to characterize sex differences in four rat P450 3A enzymes following vehicle and pregnenolone 16alpha-carbonitrile treatment." Arch Biochem Biophys **446**(2): 101-110.
- Johanson, C. E., J. A. Duncan, E. G. Stopa and A. Baird (2005). "Enhanced prospects for drug delivery and brain targeting by the choroid plexus-CSF route." Pharm Res **22**(7): 1011-1037.
- Johnson, C. H., A. D. Patterson, J. R. Idle and F. J. Gonzalez (2012). "Xenobiotic metabolomics: major impact on the metabolome." Annu Rev Pharmacol Toxicol **52**: 37-56.
- Kim, S. H., I. C. Lee, H. S. Baek, I. S. Shin, C. Moon, C. S. Bae, S. H. Kim, J. C. Kim and H. C. Kim (2014). "Mechanism for the protective effect of diallyl disulfide against cyclophosphamide acute urotoxicity in rats." Food Chem Toxicol **64**: 110-118.
- Kondratova, A. A. and R. V. Kondratov (2012). "The circadian clock and pathology of the ageing brain." Nature Reviews Neuroscience **13**(5): 325-335.
- Košir, R., K. Španinger and D. Rozman (2013). "Circadian events in human diseases and in cytochrome P450-related drug metabolism and therapy." IUBMB life **65**(6): 487-496.
- Kurzawski, M., V. Dziedziejko, M. Post, M. Wojcicki, E. Urasinska, J. Mietkiewski and M. Drozdziak (2012). "Expression of genes involved in xenobiotic metabolism and transport in end-stage liver disease: up-regulation of ABCC4 and CYP1B1." Pharmacol Rep **64**(4): 927-939.
- Levi, F. and U. Schibler (2007). "Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **47**: 593-628.
- Li, Y. H., Y. Q. Zhang, L. Li, Q. Wang and N. S. Wang (2008). "Effect of Danggui and Honghua on Cytochrome P450 1A2, 2C11, 2E1 and 3A1 mRNA Expression in Liver of Rats." Am J Chin Med **36**(6): 1071-1081.
- Marques, F., J. C. Sousa, N. Sousa and J. A. Palha (2013). "Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **8**: 38.
- Martignoni, M., G. M. Groothuis and R. de Kanter (2006). "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction." Expert Opin Drug Metab Toxicol **2**(6): 875-894.
- Matsuo, A. Y., E. P. Gallagher, M. Trute, P. L. Stapleton, R. Levado and D. Schlenk (2008). "Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **147**(1): 78-84.
- Maury, E., K. M. Ramsey and J. Bass (2010). "Circadian rhythms and metabolic syndrome from experimental genetics to human disease." Circulation Research **106**(3): 447-462.
- Meyer, R. P. and M. Gehlhaus (2010). "A role for CYP in the drug-hormone crosstalk of the brain." Expert Opin Drug Metab Toxicol **6**(6): 675-687.
- Miksys, S. and R. F. Tyndale (2013). "Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain." J Psychiatry Neurosci **38**(3): 152-163.
- Miksys, S. L. and R. F. Tyndale (2002). "Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain." J Psychiatry Neurosci **27**(6): 406-415.

Minn, A., S. Leclerc, J.-M. Heydel, A.-L. Minn, C. Denizot, M. Cattarelli, P. Netter and D. Gradinaru (2002). "Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier." Journal of drug targeting **10**(4): 285-296.

Mohawk, J. A., C. B. Green and J. S. Takahashi (2012). "Central and peripheral circadian clocks in mammals." Annu Rev Neurosci **35**: 445-462.

Monostory, K. and Z. Dvorak (2011). "Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450." Curr Drug Metab **12**(2): 154-172.

Mori, K., P. E. Blackshear, E. K. Lobenhofer, J. S. Parker, D. P. Orzech, J. H. Roycroft, K. L. Walker, K. A. Johnson, T. A. Marsh, R. D. Irwin and G. A. Boorman (2007). "Hepatic transcript levels for genes coding for enzymes associated with xenobiotic metabolism are altered with age." Toxicol Pathol **35**(2): 242-251.

Mortazavi, M. M., C. J. Griessenauer, N. Adeeb, A. Deep, R. Bavarsad Shahripour, M. Loukas, R. I. Tubbs and R. S. Tubbs (2014). "The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations." Childs Nerv Syst **30**(2): 205-214.

Mukai, M., T. M. Lin, R. E. Peterson, P. S. Cooke and S. A. Tischkau (2008). "Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." J Biol Rhythms **23**(3): 200-210.

Muskhelishvili, L., P. A. Thompson, D. F. Kusewitt, C. Wang and F. F. Kadlubar (2001). "In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues." J Histochem Cytochem **49**(2): 229-236.

Nebert, D. W. and D. W. Russell (2002). "Clinical importance of the cytochromes P450." Lancet **360**(9340): 1155-1162.

Neve, E. P. and M. Ingelman-Sundberg (2008). "Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450." Anal Bioanal Chem **392**(6): 1075-1084.

Ohta, H., S. Yamazaki and D. G. McMahon (2005). "Constant light desynchronizes mammalian clock neurons." Nat Neurosci **8**(3): 267-269.

Paschos, G. K., J. E. Baggs, J. B. Hogenesch and G. A. FitzGerald (2010). "The role of clock genes in pharmacology." Annual review of pharmacology and toxicology **50**: 187-214.

Patterson, A. D., F. J. Gonzalez and J. R. Idle (2010). "Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer." Chem Res Toxicol **23**(5): 851-860.

Praetorius, J. (2007). "Water and solute secretion by the choroid plexus." Pflugers Arch **454**(1): 1-18.

Quintela, T., I. Gonçalves, L. C. Carreto, M. A. Santos, H. Marcelino, F. M. Patriarca and C. R. Santos (2013). "Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays." PloS one **8**(4): e60199.

Quintela, T., C. Sousa, F. Patriarca, I. Gonçalves and C. Santos (2014). "Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus." Brain Structure and Function: 1-12.

Rana, S. and S. Mahmood (2010). "Circadian rhythm and its role in malignancy." Journal of circadian rhythms **8**(1): 3.

Rataj, F., F. J. Moller, M. Jahne, O. Zierau, P. Diel, G. Vollmer and G. Kretzschmar (2012). "Regulation of uterine AHR battery gene expression by 17beta-Estradiol is predominantly mediated by estrogen receptor alpha." Arch Toxicol **86**(10): 1603-1612.

- Rath, M. F., L. Rosing and M. Moller (2014). "Circadian oscillators in the mouse brain: molecular clock components in the neocortex and cerebellar cortex." Cell Tissue Res.
- Redzic, Z. B., J. E. Preston, J. A. Duncan, A. Chodobski and J. Szmydynger-Chodobska (2005). "The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging." **71**: 1-52.
- Redzic, Z. B. and M. B. Segal (2004). "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1695-1716.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2001). "Molecular analysis of mammalian circadian rhythms." Annual Review of Physiology **63**(1): 647-676.
- Roenneberg, T. and M. Mewes (2003). "The network of time: understanding the molecular circadian system." Curr Biol **13**(5): R198-207.
- Roman, R. J. (2002). "P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function." Physiol Rev **82**(1): 131-185.
- Rowlands, J. C., H. Wang, R. Hakkak, M. J. Ronis, H. W. Strobel and T. M. Badger (2000). "Chronic intragastric infusion of ethanol-containing diets induces CYP3A9 while decreasing CYP3A2 in male rats." J Pharmacol Exp Ther **295**(2): 747-752.
- Salgado-Delgado, R., A. Tapia Osorio, N. Sadri and C. Escobar (2011). "Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of depression." Depression research and treatment **2011**.
- Saunders, N. R., R. Daneman, K. M. Dziegielewska and S. A. Liddelow (2013). "Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult." Molecular aspects of medicine **34**(2): 742-752.
- Schulz, P. and T. Steimer (2009). "Neurobiology of circadian systems." CNS drugs **23**(2): 3-13.
- Serot, J. M., J. Zmudka and P. Jouanny (2012). "A possible role for CSF turnover and choroid plexus in the pathogenesis of late onset Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **30**(1): 17-26.
- Sissung, T. M., D. K. Price, A. Sparreboom and W. D. Figg (2006). "Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention." Mol Cancer Res **4**(3): 135-150.
- Skipor, J. and J. C. Thiery (2008). "The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain." Acta Neurobiol Exp (Wars) **68**(3): 414-428.
- Smith, D. E., C. E. Johanson and R. F. Keep (2004). "Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1765-1791.
- Snell, R. S. (2010). Clinical neuroanatomy. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Spector, R. and C. E. Johanson (2013). "Sustained choroid plexus function in human elderly and Alzheimer's disease patients." Fluids Barriers CNS **10**(1): 28.
- Sukumaran, S., R. R. Almon, D. C. DuBois and W. J. Jusko (2010). "Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action." Advanced drug delivery reviews **62**(9): 904-917.
- Tanimura, N., N. Kusunose, N. Matsunaga, S. Koyanagi and S. Ohdo (2011). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner." Toxicology **290**(2-3): 203-207.

- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, S. Kyo, T. Kanaya, M. Inoue and T. Yokoi (2004). "Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor." Cancer Res **64**(9): 3119-3125.
- Uppstad, H., S. Ovrebø, A. Haugen and S. Møllerup (2010). "Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines." Toxicol Lett **192**(2): 221-228.
- Wang, A., U. Savas, C. D. Stout and E. F. Johnson (2011). "Structural characterization of the complex between alpha-naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1." J Biol Chem **286**(7): 5736-5743.
- Wang, H., K. L. Napoli and H. W. Strobel (2000). "Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones." Mol Cell Biochem **213**(1-2): 127-135.
- Wauthier, V., R. K. Verbeeck and P. B. Calderon (2007). "The effect of ageing on cytochrome p450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly." Curr Med Chem **14**(7): 745-757.
- Weerasinghe, G. R., S. I. Rapoport and F. Bosetti (2004). "The effect of chronic lithium on arachidonic acid release and metabolism in rat brain does not involve secretory phospholipase A2 or lipoxygenase/cytochrome P450 pathways." Brain Res Bull **63**(6): 485-489.
- Welsh, D. K., J. S. Takahashi and S. A. Kay (2010). "Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties." Annual review of physiology **72**: 551.
- Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen (2000). "Cytochromes P450: a success story." Genome Biol **1**(6): REVIEWS3003.
- Wojcikowski, J., A. Haduch and W. A. Daniel (2013). "Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver." Pharmacol Rep **65**(5): 1247-1255.
- Wolburg, H. and W. Paulus (2010). "Choroid plexus: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 75-88.
- Yang, X. (2010). "A wheel of time: the circadian clock, nuclear receptors, and physiology." Genes Dev **24**(8): 741-747.
- Zelinski, E. L., S. H. Deibel and R. J. McDonald (2014). "The trouble with circadian clock dysfunction: Multiple deleterious effects on the brain and body." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **40**: 80-101.
- Zmrzljak, U. P. and D. Rozman (2012). "Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters." Chemical research in toxicology **25**(4): 811-824.