



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Análise eletrofisiológica da via de transdução olfativa no plexo coróide

Daniela Batista Barreiros

Tese para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Cecília Santos
Co-orientador: Prof. Doutor Peter Hubbard

Covilhã, Junho de 2014

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva
responsabilidade da autora

(Daniela Batista Barreiros)

Resumo

O plexo coróide é um tecido conectivo altamente vascularizado, constituído maioritariamente por uma monocamada de células epiteliais que derivam das células endimárias dos ventrículos. A sua principal função é a produção de líquido cefalorraquidiano e é responsável por conferir uma protecção mecânica e química ao cérebro. Estudos anteriores revelaram a expressão de receptores olfactivos e a expressão das proteínas importantes para a transdução olfactiva no plexo coróide.

Assim sendo, o presente trabalho avalia qual a funcionalidade da via de transdução olfactiva no plexo coróide, através de técnicas de electrofisiologia, usando como estímulos odoríficos as poliaminas. Os resultados obtidos neste trabalho experimental sugerem que a cascata de transdução olfactiva encontra-se activa e constata a existência de 2 vias de transdução: a via da fosfolipase C e a via da Adenil ciclase. A presença de receptores olfactivos e de vias de transdução podem ter não só a função de identificação de odores e de processamento de sinal mas também podem ter a função de regulação da composição do líquido cefalorraquidiano induzindo respostas celulares de acordo com as necessidades fisiológicas do sistema nervoso central, funcionando como um sistema de protecção.

Palavras-chave: Plexo coróide; líquido cefalorraquidiano; transdução olfactiva; poliaminas.

Abstract

The choroid plexus is a highly vascularized connective tissue primarily constituted by a monolayer of epithelial cells derived from the ependymal cells of the ventricles. Its main function is the production of cerebrospinal fluid and it is responsible for conferring mechanical and chemical protection to the brain. Previous studies revealed the expression of olfactory receptors and expression of proteins important for olfactory transduction in choroid plexus.

Therefore the present work evaluates which olfactory transduction pathways is used by the choroid plexus, through techniques of electrophysiology, using polyamines as odorous stimuli. The results of this experimental study suggest that the olfactory transduction cascade is active in the choroid plexus and notes the existence of 3 transduction pathways: the phospholipase C pathway and the adenil ciclase pathway.

The presence of olfactory receptors and transduction pathways have not only the function of identifying odors and signal processing but also have the function of regulation of the composition of cerebrospinal fluid inducing cellular responses according to the physiological needs of the central nervous system, functioning as a protection system.

Key-words: Choroid Plexus; cerebrospinal Fluid; olfactory transduction; poliamines.

Índice

I. Introdução	1
1. Sistema Ventricular	1
2. Plexo Coróide	2
2.1. Funções	3
2.1.1. Produção de LCR	3
2.1.2. Protecção mecânica e química	3
2.1.3. Remoção de solutos tóxicos.....	3
2.1.3.1. Polipeptídeos de transporte de aniões orgânicos.....	3
2.1.3.2. Proteína relacionada com o receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LRP)	4
2.1.3.3. Transportadores ABC.....	4
2.1.4. Função imunológica	4
2.1.5. Produção de proteínas	4
3. Líquido cefalorraquidiano	5
3.1. Composição.....	5
3.2. Formação de LCR.....	6
3.3. Regulação da secreção de LCR.....	7
3.4. Circulação de LCR	7
4. Sistema olfactivo	9
4.1. Transdução de sinal.....	10
5. Poliaminas	11
5.1. Definição.....	11
5.2. Síntese de poliaminas	13
5.3. Catabolismo de poliaminas	13
5.4. Função.....	14
5.4.1. Proliferação celular e regulação da expressão génica	14
5.4.2. Indução da apoptose celular	15
5.4.3. Regulação de canais iónicos	15
5.4.3.1. Receptores de glutamato	15
5.4.3.2. Canais Kir	15
II. Objectivo	17
III. Materiais e métodos.....	18
1. Animais	18
2. DC Field Potential Electro-olfactograma (EOG)	18
2.1. Estudo de estabilidade	19
2.2. Adição de estímulos	19

2.3. Estudo de especificidade	19
2.4. Estudos farmacológicos	19
3. Análise estatística	20
IV. Resultados	21
1. Análise da viabilidade cerebral	21
2. Respostas olfactivas às poliaminas	21
3. Estudo de especificidade	22
4. Análise das vias de transdução	23
4.1. Inibidor U73122	23
4.2. Inibidor SQ22356	25
4.3. Tetracaína	27
4.4. L-cis-Diltiazem	29
5. Bourgeonal e Undecanal	31
V. Discussão	32

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação dos ventrículos cerebrais no humano. No cérebro humano adulto, existem quatro ventrículos ligados: dois ventrículos laterais, um terceiro ventrículo situado no diencéfalo e quarto ventrículo situada entre o cerebelo e a ponte 1
- Figura 2:** Representação morfológica do plexo coróide 2
- Figura 3:** Mecanismo de transporte de iões demonstrado no plexo coróide. No lado em contacto com o líquido cefalorraquidiano encontra-se a bomba Na^+/K^+ ATPase, os canais de Cl^- e K^+ e a aquaporina I. No lado em contacto com o sangue encontra-se o cotransportador $\text{Na}^+/\text{k}^+/2\text{Cl}^-$ que coexistem com os anti-transportadores de Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 6
- Figura 4:** O LCR formado no CP circula através do sistema ventricular e através dos forames de Magendie e Luscka para as cisternas basais. Das cisternas basais circula para aos espaços subaracnóides até aos locais de absorção 8
- Figura 5:** Cascatas de sinalização envolvidas na transdução olfactiva. (A) Diagrama da sinalização mediada por nucleotídeos cíclicos no compartimento de transdução (cilios olfactivos) dos neurónios receptores olfactivos. (B) Diagrama de sinalização mediada pelo fosfoinositol no compartimento de transdução (cilios olfactivos) dos neurónios receptores olfactivos 11
- Figura 6:** Nomes e estruturas das poliaminas 12
- Figura 7:** Percurso de biossíntese e degradação das poliaminas. a. Biossíntese; b. degradação. As setas a verde indicam o percurso de biossíntese e degradação de poliaminas nas plantas, as setas a azul nas bactérias e as setas a vermelho nos animais 14
- Figura 8:** Time-course do CP ao tempo indicado após injeção com cadaverina a uma diluição de 1:1000. Dados expressos em média \pm s.e.m. 21
- Figura 9:** Relação dose resposta à poliamina cadaverina (n machos = 13; n fêmeas =9) (A), putrescina (n machos = 13; n fêmeas =10) (B), espermina (n machos = 12; n fêmeas =10) (C) e espermidina (n machos = 10; n fêmeas =11) (D). Dados expressos em média \pm s.e.m. 22
- Figura 10:** Relação dose resposta aos aminoácidos ornitina (n machos = 4; n fêmeas =8) (A) e lisina (n machos = 4; n fêmeas =8) (B). Dados expressos em média \pm s.e.m. 23
- Figura 11:** Exemplos representativos de respostas Dc field potential em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de U73122 $10\mu\text{M}$: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas. 24
- Figura 12:** Respostas olfactivas das poliamina cadaverina (n machos = 9; n fêmeas =7) (A), putrescina (n machos = 8; n fêmeas =7) (B), espermina (n machos = 8; n fêmeas =8) (C) e espermidina (n machos = 8; n fêmeas =7) com o uso do inibidor da fosfolipase C. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ 25
- Figura 13:** Exemplos representativos de respostas Dc field potential em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de SQ2235 125

μM : (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.	26
Figura 14: respostas olfactivas das poliamina cadaverina (n machos = 4; n fêmeas =4) (A), putrescina (n machos = 3; n fêmeas=3) (B), espermina (n machos = 4; n fêmeas =4) (C) e espermidina (n machos = 4; n fêmeas =4) com o uso do inibidor da adenil ciclase. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$	27
Figura 15: Exemplos representativos de respostas Dc field potential em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de tetracaína 1mM: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.	28
Figura 16: respostas olfactivas das poliamina cadaverina (n machos = 8; n fêmeas =11) (A), putrescina (n machos = 6; n fêmeas =10) (B), espermina (n machos = 8; n fêmeas =9) (C) e espermidina (n machos = 8; n fêmeas =12) com o uso do inibidor de CNG. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$	28
Figura 17: Exemplos representativos de respostas Dc field potential em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de L-cis-Diltiazem 1mM: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.	30
Figura 18: Respostas olfactivas das poliamina cadaverina (n machos = 5; n fêmeas =7) (A), putrescina (n machos = 4; n fêmeas =4) (B), espermina (n machos = 5; n fêmeas =7) (C) e espermidina (n machos = 5; n fêmeas =8) com o uso do inibidor de CNC. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$	31
Figura 19: Respostas olfactivas aos odorantes bourgeonal (n machos = 7; n fêmeas =4) e undecanal (n machos = 6; n fêmeas =3). Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$	31

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração de vários solutos (mEq/Kg) no plasma e no CSF5

Lista de Acrónimos

AC - Adenil ciclase

ANP - Péptido natriuretico atrial

AVP - Vasopressina arginina

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

ApoE4 - apolipoprotein E4

ATP - Adenosina trifosfato

CNG - Canal catiónico nucleotídeo cíclico

CP - Plexo coróide

IGF-II - Factor de crescimento semelhantes à insulina do tipo II

IP3 - Inositol 1,4,5 trifosfato

LCR - Líquido cefalorraquidiano

NGF - Factor de crescimento neural

ODC - Ornitina-descarboxilase

ORN - Neurónios dos receptores olfactivos

PAO - Poliamina oxidase

PI - Fosfatidilinositol

PIP 2 - Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato

PI3K - Fosfatidil-inositol 3 quinase

PLC - Fosfolipase C

SAM - S-adenosil-metionina

TNF α - Factor de necrose tumoral α

TGF β - factor de transformação do crescimento β

VEGF - factor de crescimento endotelial vascular

I. Introdução

1. Sistema Ventricular

O LCR é produzido maioritariamente nos plexos coróides localizados nas paredes do terceiro e quarto ventrículo assim como nas paredes internas dos ventrículos laterais (Lowery and Sive 2009), ocorrendo a principal produção de LCR nos ventrículos laterais (Melo, Garcia et al. 2003). Os ventrículos são uma série de cavidades interligadas dentro do sistema nervoso central revestidos por células endoteliais que possuem grandes quantidades de cílios na sua superfície apical facilitando o movimento do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Ibanez-Tallon, Pagenstecher et al. 2004). No cérebro humano adulto existem quatro ventrículos. Os dois ventrículos laterais estão ligados ao terceiro ventrículo pelo foramen de Monro. O terceiro ventrículo está centrado em redor ao plano sagital médio numa posição inferior aos ventrículos laterais e superior ao quarto ventrículo. A ligação do terceiro ao quarto ventrículo é assegurada pelo aqueduto de Sylvius. Por sua vez, o quarto ventrículo está ligado com o canal da medula espinal e com o espaço subaracnóide que envolve o cérebro. O quarto ventrículo liga-se ao espaço subaracnóide pelas aberturas lateral (foramen de Luchka) e média (foramen de Magendie) (Lowery and Sive 2009).



Figura 1: Representação dos ventrículos cerebrais no humano. No cérebro humano adulto, existem quatro ventrículos ligados: dois ventrículos laterais, um terceiro ventrículo situado no diencéfalo e quarto ventrículo situada entre o cerebelo e a ponte (Lowery and Sive 2009).

2. Plexo Coróide

Um controlo contínuo do fluido extracelular do sistema nervoso central é essencial para um processamento neuronal eficiente. Esse controlo é conseguido através da barreira endotelial sangue-cérebro (BBB) e a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BCSFB) formado pelo plexo coróide (Redzic 2011).

O plexo coróide é um tecido conectivo altamente vascularizado (Pietzsch-Rohrschneider 1980). No núcleo do tecido conectivo encontram-se os capilares fenestrados, que proporcionam uma base fisiológica para a produção de LCR a partir do sangue (Schroten, Hanisch et al. 2012), células dendríticas, macrófagos e fibroblastos, que representam a primeira barreira de defesa contra infecções cerebrais (Pietzsch-Rohrschneider 1980).

O plexo coróide é constituído maioritariamente por uma monocamada de células epiteliais cúbicas que derivam das células endimárias das paredes dos ventrículos cerebrais (Falcao, Marques et al. 2012). As células epiteliais estão envolvidas por microvilosidades que aumentam o contacto com o LCR (Falcao, Marques et al. 2012) e estão conectadas por tight-junctions constituindo a estrutura base da barreira hematoencefálica, responsável por regular a entrada de substâncias fisiologicamente importantes (Spuch and Carro 2011).

As células epiteliais contêm numerosas mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático liso o que demonstra que é uma estrutura com grande capacidade de síntese. Contém também um elevado número de vesículas no citoplasma com características lisossomais. São polarizadas, apresentando um compartimento basolateral e um apical. No lado apical encontram-se as microvilosidades e por isso está em contacto com o LCR, enquanto que o lado basolateral projecta-se para o sangue e encontra-se no lado do estroma em contacto com um grande número de capilares, tendo como consequência o contacto activo com as moléculas que passam livremente através dos capilares (Pietzsch-Rohrschneider 1980).

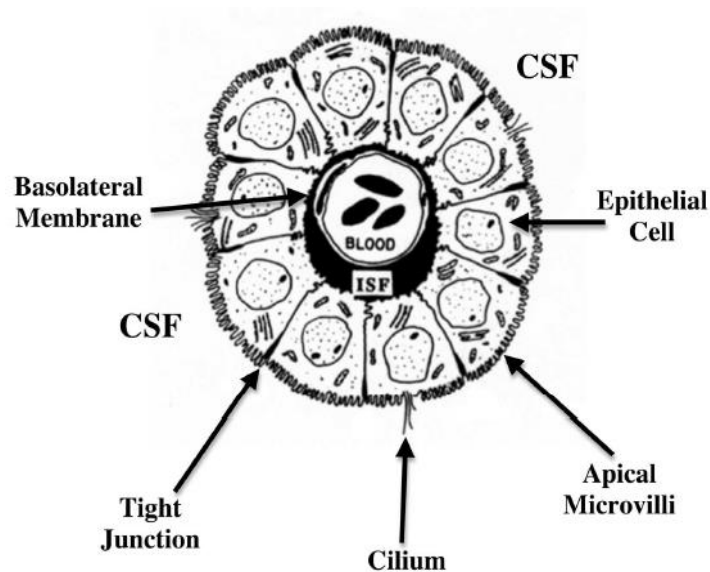


Figura 2: Representação morfológica do plexo coróide (Johanson, Stopa et al. 2011).

2.1. Funções

2.1.1. Produção de LCR:

A principal função do CP é produzir e secretar a maior parte do LCR através da combinação de várias enzimas, canais iônicos e transportadores localizados nas células epiteliais (Spector and Johanson 2013). O LCR é um líquido aquoso incolor, inodoro e com baixa concentração de células e proteínas (Bim, Pinotti et al. 2013). Nos humanos, circulam aproximadamente 150-270 ml LCR, dos quais apenas 25% desse volume encontra-se nos ventrículos. O resto do fluido enche as cisternas basais e o espaço subaracnóide e passa em torno da medula espinhal (Skipor and Thiery 2008).

2.1.2. Protecção mecânica e química:

Além de formar LCR, o CP protege homeostaticamente o cérebro. Ajuda a manter a composição química do líquido extracelular do SNC num estado estável e define a composição iônica, pH e osmolaridade do LCR (Johanson, Stopa et al. 2011). Devido à baixa permeabilidade imposta pelas tight-junctions, o movimento de pequenos íons, péptidos ou drogas hidrofílicas é limitado pelo que a importação e exportação de solutos são mediadas por sistemas de transportadores especializados (Schroten, Hanisch et al. 2012).

2.1.3. Remoção de solutos tóxicos:

O CP contém uma multiplicidade de transportadores de soluto responsáveis pela remoção de ácidos orgânicos e péptidos tóxicos (Johanson, Stopa et al. 2011).

2.1.3.1. Polipeptídeos de transporte de aniões orgânicos

Localizados na membrana apical do CP são responsáveis pela remoção de um largo espectro de solutos orgânicos anfipáticos do LCR como os conjugados esteróides, o ácido homovanílico (um dos principais metabólitos de neurotransmissores de catecolaminas), sais biliares, oligopéptidos aniônicos, drogas e xenobióticos (Johanson, Stopa et al. 2011).

2.1.3.2. Proteína relacionada com o receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LRP)

Tem um largo espectro de afinidade com o substrato e é responsável pela eliminação de até quarenta tipos de moléculas incluindo APOE4, proteína precursora de amilóide, e fragmentos amilóide oligopeptídeos, evitando que peptídeos e fragmentos peptídicos no LCR atinjam níveis tóxicos (Johanson, Stopa et al. 2011).

2.1.3.3. Transportadores ABC

Os transportadores ABC não só removem metabolitos exógenos do cérebro mas também limita a captação e penetração de vários compostos terapêuticos. Os seus substratos variam desde pequenos iões a grandes polipéptidos e o seu transporte ocorre contra o gradiente de concentração usando energia proveniente da hidrólise de ATP (Redzic 2011).

2.1.4. Função imunológica:

O CP interage dinamicamente com o sistema imune através de mecanismos que suportam uma imunovigilância contínua e uma resposta específica a doenças e danos cerebrais. A função imunológica é conseguida pela expressão de moléculas de adesão na superfície das células epiteliais, pela capacidade de apresentação de antígenos às células T e pela existência de grandes quantidades de macrófagos e células dendríticas no estroma do CP (Meeker, Williams et al. 2012).

2.1.5. Produção de proteínas:

A libertação de péptidos para o cérebro desempenha um papel importante na sua condição fisiológica. Em várias doenças neurodegenerativas a aplicação de fatores de crescimento/péptidos neuroactivos pode providenciar um ambiente neuronal protetor e pode estimular a reparação e crescimento neuronal (Redzic 2011). Vários estudos demonstraram a presença de proteínas, citocinas, factores de crescimento e hormonas no CP, como a interleucina - 1 β , interleucina - 6, TNF α , o IGF-II, NGF, TGF β , VEGF, transferrina, transtirretina e vasopressina. A maior parte destas substâncias têm os seus próprios receptores no CP e, por conseguinte, podem agir de forma autócrina ou parácrina, regulando a formação de LCR (Skipor and Thiery 2008).

3. Líquido Cefalorraquidiano

3.1. Composição

O líquido cefalorraquidiano resulta de uma secreção ativa a partir das células epiteliais do plexo coróide. Comparado com ultrafiltrado do plasma, o LCR tem uma composição única, contendo concentrações mais elevadas de cloro, sódio e magnésio e concentrações mais baixas de potássio, cálcio, glicose, proteínas, aminoácidos, ácido úrico, potássio, bicarbonato de cálcio e fosfato. Os níveis de folato e ascorbato são 3 a 4 vezes superior no LCR do que no plasma, indicando um transporte ativo (Skipor and Thiery 2008; Serot, Zmudka et al. 2012). Embora a concentração proteica seja mais baixa no LCR, as concentrações relativas da maioria das proteínas é muito semelhante à do plasma. Esta descoberta levou à conclusão de que a transferência de proteínas a partir do sangue para o LCR é principalmente um processo controlado por difusão passiva. Embora existam várias proteínas específicas do LCR, a transtirretina sobressai como uma proteína específica sintetizada pelo plexo coróide no qual a sua síntese antecede a do fígado e pode ter um papel chave no transporte de hormonas tiroideias no desenvolvimento neural. O pH do LCR é ligeiramente ácido, o que reflecte uma alta pCO_2 e uma baixa capacidade tampão (Segal 2000).

Tabela 1: Concentração de vários solutos (mEq/Kg) no plasma e no CSF (Segal 2000)

Substância	Plasma	CSF
Na ⁺	159,0	147,0
K ⁺	4,63	2,86
Mg ²⁺	1,61	2,23
Ca ²⁺	4,70	2,28
Cl ⁻	99,0	113,0
HCO ³⁻	26,8	23,3
P _i (mg/100ml)	4,70	3,40
Aminoácidos	2,62	0,72
Osmolaridade	289,0	289,0
pH	7,397	7,30
pCO ₂ (mm Hg)	41,1	50,5

3.2. Formação de LCR

A formação de LCR ocorre em duas etapas. A primeira consta de uma filtração passiva do sangue pelo endotélio capilar coroidal, a qual é proporcional ao gradiente de pressão hidrostática entre o sangue e o fluido intersticial coróide; a segunda consta de uma secreção ativa pelo epitélio monoestratificado (Comar, Machado et al. 2009).

Nesta etapa a formação de LCR envolve um transporte activo e unidireccional de iões de um lado da membrana epitelial do CP para outro, criando um gradiente osmótico que é acompanhado pelo movimento de água. Este movimento de iões é mediado por transportadores específicos e canais iónicos distribuídos desigualmente no lado basolateral e apical da membrana epitelial do PC (Redzic 2011).

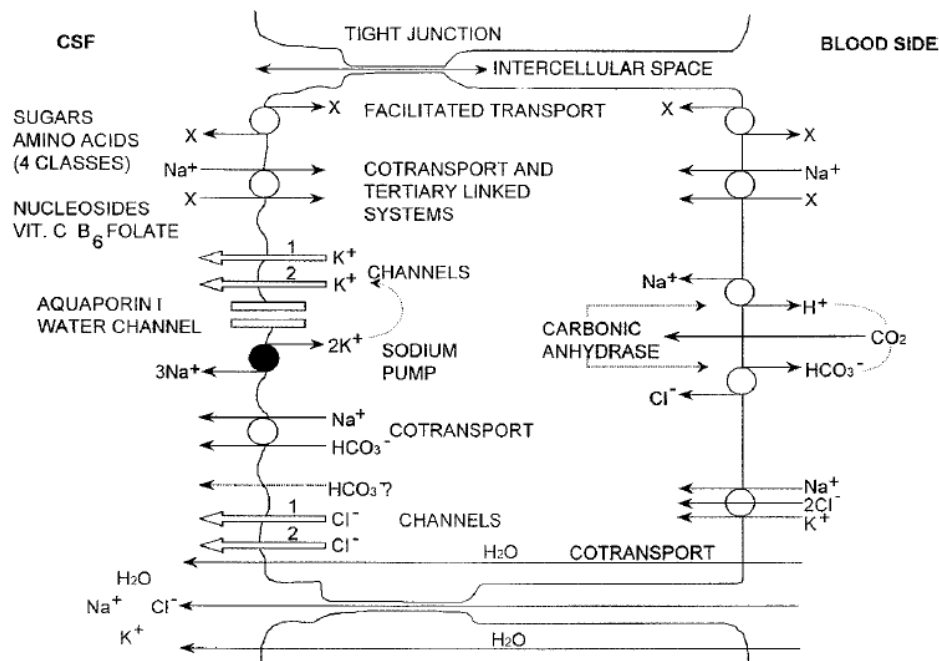


Figura 3: Mecanismo de transporte de iões demonstrado no plexo coróide. No lado em contacto com o líquido cefalorraquidiano encontra-se a bomba Na⁺/K⁺ ATPase, os canais de Cl⁻ e K⁺ e a aquaporina I. No lado em contacto com o sangue encontra-se o cotransportador Na⁺/k⁺/2Cl⁻ que coexistem com os anti-transportadores de Na⁺/H⁺ e Cl⁻/HCO₃⁻ (Segal 2000).

No lado basolateral a bomba Na⁺/H⁺ e a bomba Cl⁻/HCO₃⁻ estão directamente envolvidas na formação de LCR, transferindo para o interior da membrana epitelial do CP iões Na⁺ e Cl⁻ e para o exterior iões H⁺ e HCO₃⁻ respectivamente. Estes transportadores controlam assim a composição iónica e o pH intracelular (Redzic 2011).

Uma enzima importante para a formação de LCR é a anidrase carbónica. Esta enzima contribui indirectamente para a secreção do LCR pois catalisa a conversão de água e CO₂ em HCO₃⁻ e H⁺. Os iões HCO₃⁻ e H⁺ são depois transferidos então pelas bombas acima referidas.

O lado apical da membrana, ou seja, o lado em contacto com os ventrículos, contém as bombas Na^+/K^+ -ATPase que transporta 3 iões Na^+ para fora das células sanguíneas e 2 iões de K^+ para dentro com gasto de energia através da hidrólise de ATP. O co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ contribui para a secreção de Na^+ e Cl^- e é regulado pelo gradiente intracelular de Cl^- e pelos canais selectivos de K^+ e HCO_3^- e pela sinalização PKC (Iran 2009).

Estes transportadores são importantes na formação de LCR pois o fluxo de K^+ é essencial na homeostase do cérebro uma vez que mudanças na concentração afectam o potencial de repouso da membrana (Redzic 2011). Ainda no lado apical encontram-se os canais de aquaporina 1, que facilitam o movimento de água através da interface sangue-LCR (Iran 2009).

3.3. Regulação da secreção de LCR

A produção de LCR está sob o controlo de factores que operam em ambos os lados da membrana do plexo coróide. No lado basolateral do epitélio, os nervos noradrenérgicos e colinérgicos podem exercer controlo directo, diminuindo ou aumentando a sua produção (Veening and Barendregt 2010). O sistema nervoso simpático reduz a secreção de LCR enquanto os nervos colinérgicos aumentam a secreção (Sakka, Coll et al. 2011).

Monoaminas e neuropeptídeos também desempenham um papel na regulação da secreção de LCR. Os receptores de dopamina, serotonina, melatonina, péptido natriuretico atrial (ANP) e vasopressina arginina (AVP) estão presentes na superfície do epitélio do PC. A ANP atua na aquaporina 1 diminuindo a secreção de LCR e a AVP também diminui a secreção através da interacção com a angiotensina II. A variação de ambas está envolvida na hidrocefalia e na demência da doença de Alzheimer (Johanson, Duncan et al. 2008; Sakka, Coll et al. 2011). A serotonina regula a produção de LCR através de ligação aos receptores $5\text{-HT}_2\text{C}$, reduzindo a secreção de LCR (Veening and Barendregt 2010).

3.4. Circulação de LCR

Dois tipos de fluxo podem ser distinguidos na circulação de LCR: o fluxo de massa e o fluxo pulsátil. O fluxo de massa, corresponde à circulação, causada por um gradiente de pressão hidrostática de LCR do local onde é produzido, local de alta pressão, para onde é absorvido, local de baixa pressão (Battal, Kocaoglu et al. 2011). No fluxo pulsátil, existe um movimento rápido para trás e para a frente que é relacionada com o ciclo cardíaco. A cada batimento cardíaco, o sangue é bombeado para o cérebro durante a sístole, forçando o CSF a mover-se caudalmente. Durante a diástole, os vasos sanguíneos relaxam e o LCR tem um movimento cranial (Kelly 2013).

O LCR tem um fluxo essencialmente unidireccional através do sistema ventricular e em direcções diferentes através das cisternas dos espaços subaracnóides que envolvem o cérebro, fornecendo um ambiente protetor (Veening and Barendregt 2010).

O LCR desloca-se de locais de formação, através dos ventrículos e espaço subaracnóide, para os locais de reabsorção. O fluido circula a partir dos ventrículos laterais através do forame interventricular ou forame de Monro para o terceiro ventrículo e daí pelo aqueduto de Sylvius para o quarto ventrículo. A partir do quarto ventrículo, o líquido passa para as várias cisternas basais e, em seguida, para o espaço subaracnóide através de forames de Luschka e forame de Magendie (Skipor and Thiery 2008).

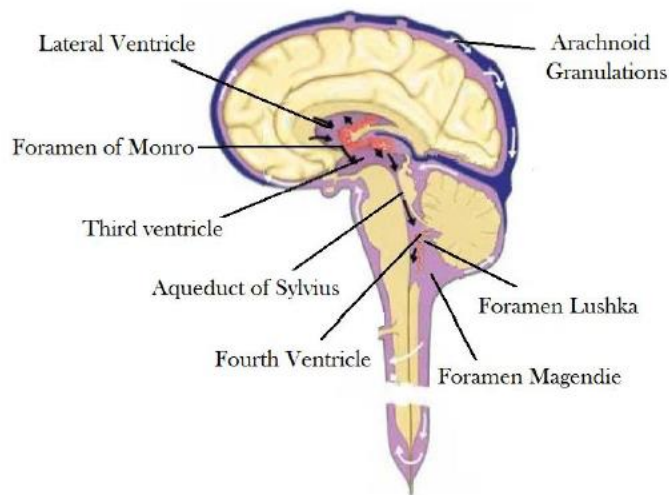


Figura 4: O LCR formado no CP circula através do sistema ventricular e através dos forames de Magendie e Luschka para as cisternas basais. Das cisternas basais circula para aos espaços subaracnóides até aos locais de absorção (Bim, Pinotti et al. 2013).

Não há comunicação funcional entre os ventrículos cerebrais e os espaços subaracnóide em qualquer região, excepto a partir do quarto ventrículo. A absorção do líquido cefalorraquidiano é um processo dual. A absorção dá-se a partir da rápida drenagem através das vilosidades aracnóide que invaginam para os seios venosos cerebrais mas também pela lenta drenagem para os vasos linfáticos (Battal, Kocaoglu et al. 2011). Todo este trajecto decorre em aproximadamente 1 hora, e o fluxo é mais rápido no sentido da gravidade (Comar, Machado et al. 2009). O equilíbrio entre a produção e a reabsorção do LCR ajuda a manter a pressão intracranial a níveis estáveis (5-15 mmHg) (Damkier, Brown et al. 2010), assim sendo, o constante turnover do LCR no sistema ventricular permite um funcionamento neuronal ideal pois permite uma remoção contínua de catabolitos e macromoléculas prejudiciais ao ambiente neuronal. O LCR humano é renovado três a quatro vezes por dia (Johanson, Stopa et al. 2011)

4. Sistema Olfactivo

Na maioria dos organismos, o olfacto permite reconhecer e discriminar sinais químicos presentes no ambiente que influenciam a expressão de comportamentos vitais, tais como reconhecimento de um parceiro de acasalamento ou a identificação de fontes de alimentares (Chouquet, Lucas et al. 2010).

Em ambientes terrestres, os sinais químicos podem ser voláteis ou não voláteis. Consequentemente, os vertebrados terrestres têm dois sistemas olfactivos funcionalmente e anatomicamente distintos: um sistema de detecção de substâncias voláteis, o sistema olfactivo, e outro para processar principalmente substâncias não-voláteis, o sistema vomeronasal.

Nos mamíferos, a detecção de odor tem início no epitélio olfactivo da cavidade nasal (Lledo, Gheusi et al. 2005). O epitélio olfactivo é composto por uma região de neurogénese contínua, de proliferação, migração e diferenciação, por células microvilares, por células de suporte e por células basais. As células basais são responsáveis pela substituição contínua de neurónios dos receptores olfactivos (ORNs) (Makino, Ookawara et al. 2009). As células de suporte, constituídas por microvilosidades, contêm o citocromo P-450, enzima que metaboliza xenobióticos, característica similar às células das glândulas de Bowman, local de maior produção de muco. Assim sendo acredita-se que estas células são responsáveis pela produção e regulação do muco (Doty 2001).

Os ORN são responsáveis pela codificação dos estímulos químicos que desencadeiam vários potenciais de acção propagando-se pelos axónios em direcção ao centro olfactivo do cérebro, onde a informação é processada levando a respostas fisiológicas e comportamentais (Chouquet, Lucas et al. 2010). Existem cerca de 100 milhões de ORN e para o odor ser reconhecido pelos receptores deve obedecer aos seguintes critérios: deve ser volátil de modo a se intensificar na área sensorial, deve ser solúvel em água de modo a passar pela barreira mucosa e pelas células olfactivas e dever ser lipossolúvel pois os cílios olfactivos são compostos principalmente por material lipídico (Powers 2004). Os ORN são bipolares e quando maduros estendem uma única dendrite para a superfície neuroepitelial do pólo apical. Numerosos cílios emergem a partir desta dendrite invadindo o revestimento mucoso da cavidade nasal. Nos mamíferos, os cílios são curtos (15-50 μm), finos (afinando para 0,11 μm), numerosos (em média 17 por neurónio) e não apresentam motilidade. São responsáveis por proporcionar uma grande área superficial com a qual uma molécula odorante colide.

Do pólo basal, o ORN envia um único axónio não mielinizado que transmite o sinal para o glomérulo do bulbo olfactivo, sendo o primeiro local de retransmissão (Lledo, Gheusi et al. 2005). É no bulbo olfactivo que os axónios formam sinapses excitatórias glutamatérgicas em regiões do glomérulo (Lledo, Saghatelian et al. 2004), levando o sinal excitatório até às células mitrais, células em tufo e até aos neurónios periglomerulares (Tyler, Petzold et al. 2007) que transmitem a informação de odor para o córtex olfactivo primário e, em seguida,

para as regiões corticais de ordem superior e para o sistema límbico. No córtex as expressões odoríferas são interpretadas levando às subseqüentes respostas comportamentais (Glatz and Bailey-Hill 2011).

Os receptores olfactivos desempenham ainda funções quimiosensoriais fora do epitélio olfactivo. Encontram-se também expressos na língua, em células eritróides, na próstata, intestino e no rim (Flegel, Manteniotis et al. 2013).

Estudos anteriores por microarrays reportaram a presença da maquinaria necessária para a transdução olfactiva no CP. Constataram ainda que os genes dos receptores olfactivos são regulados por hormonas sexuais, nomeadamente hormonas esteróides, por serem diferencialmente expressos em função do background hormonal (Quintela, Gonçalves et al. 2013).

4.1. Transdução de sinal

Quando as moléculas odoríferas atingem o epitélio olfactivo, ligam-se a receptores olfactivos com 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G expressos nos cílios dos ORN. Os mamíferos contêm 1000 tipos de diferentes receptores olfactivos, e cada ORN expressa apenas um ou dois destes tipos de receptores (Lapid and Hummel 2013).

Uma vez activado pelo odorante, o receptor acoplado à proteína G activa a proteína Golf que por sua vez activa a enzima adenilciclase III (AC III). A activação da AC III leva à formação do segundo mensageiro celular, a adenosina monofosfato cíclico (AMPC). A formação do AMPC leva à abertura do canal catiónico nucleotídeo cíclico (CNC) na membrana plasmática dos cílios olfactivos (Lapid and Hummel 2013).

O influxo de Ca^{2+} através dos canais CNC inicia a despolarização através de potenciais de acção em neurónios sensoriais olfactivos que são transmitidos para o bulbo olfactivo para a integração do sinal (Chen, Xia et al. 2012). O influxo de Ca^{2+} leva ainda à amplificação do sinal por abertura dos canais de Cl^{-} mas também causa a subseqüente dessensibilização e adaptação aquando um estímulo constante do odorante, por um feedback negativo, via proteína quinase dependente de AMPC: a Ca^{2+} -calmodulina aumenta a fosfodiesterase que por sua vez hidrolisa o AMPC e activa a quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK II) que inibe a Adenil ciclase e leva à dessensibilização dos canais CNC por ligação directa à calmodulina (De Palo, Boccaccio et al. 2012). Estudos com animais transgénicos sem os CNC funcionais revelam a falta de detecção da maioria dos odores, indicando que existem vias de transdução adicionais activadas por estímulos a odorantes (Rawson and Yee 2006). Há evidências de outra via de transdução através do fosfatidilinositol (PI) em ORN de mamíferos, no qual a fosfolipase C (PLC) metaboliza o fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2) nas moléculas sinalizadores diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). O DAG medeia a activação da proteína quinase C, e o IP3 liberta Ca^{2+} das reservas intracelulares. Em

conjunto, ocorre a ativação de fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) que leva à fosforilação do PIP2 para gerar PIP3 in vivo (Klasen, Corey et al. 2010).

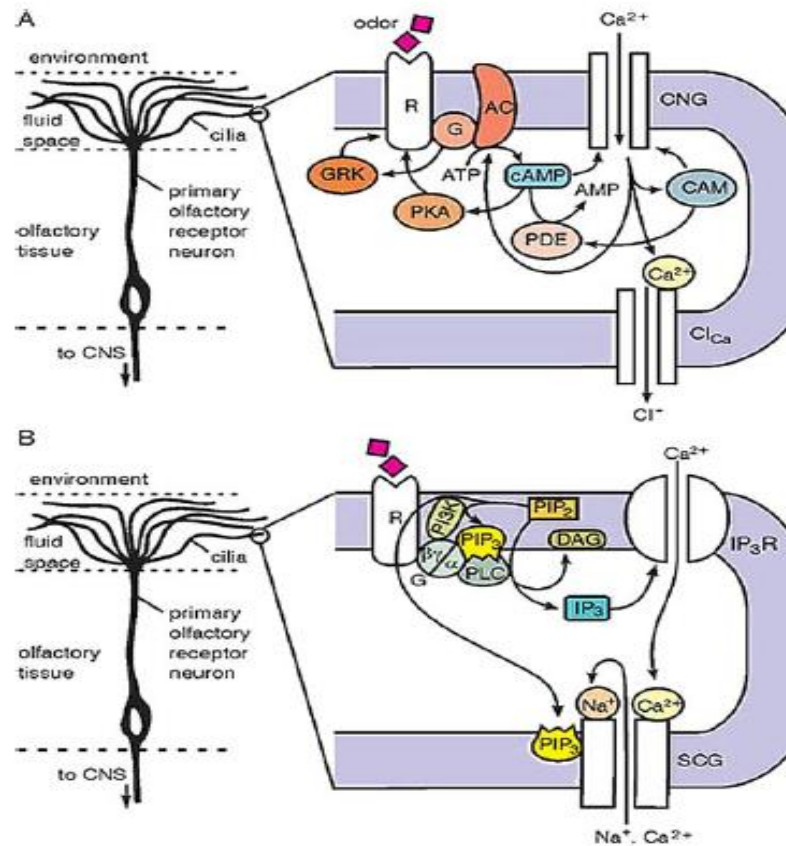


Figura 5: Cascatas de sinalização envolvidas na transdução olfativa. (A) Diagrama da sinalização mediada por nucleotídeos cíclicos no compartimento de transdução (cílios olfativos) dos neurônios receptores olfativos. (B) Diagrama de sinalização mediada pelo fosfoinositol no compartimento de transdução (cílios olfativos) dos neurônios receptores olfativos (Ache and Young 2005)

5. Poliaminas

5.1. Definição

As poliaminas naturais, putrescina, espermidina, cadaverina e espermina, são moléculas alifáticas de baixo peso molecular. São de natureza policatiónica, com uma amina primária que é totalmente protonada sob condições fisiológicas (Yatin 2002) e são solúveis em água com o valor de PKa em torno de 10 (Moinard, Cynober et al. 2005). A putrescina (1,4-diaminobutano) e a cadaverina (1,5-diaminopentano) são diaminas primárias com dois grupos amina cada um, enquanto que a espermidina [N-(3 - aminopropil)-butano-1,4-diamina] e espermina [N, N- bis (3-aminopropil)-butano-1,4-diamina] contêm três e quatro grupos amina, respectivamente. As cargas positivas das poliaminas são encontrados em intervalos espaçados

ao longo cadeias de hidrocarbonetos e devido à sua estrutura conformacional, podem servir como pontes eletrostáticas entre os fosfatos dos ácidos nucleicos e outros polímeros com carga negativa (Shah and Swiatlo 2008). as poliaminas são sintetizadas Tanto em células eucarióticas como em procarióticas. No entanto, a espermina é sintetizada preferencialmente pelas células eucarióticas (Yatin 2002).

A espermina é encontrada a altas concentrações no esperma, e em conjunto com a espermidina são responsáveis pelo odor do esperma. A putrescina e a cadaverina são compostos de decomposição bacteriana, contribuindo ambas, pelo cheiro da putrefacção do cadáver (Kusano, Berberich et al. 2008).

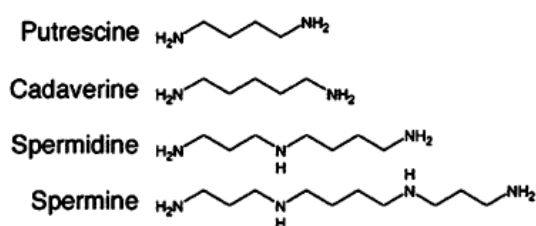


Figura 6: Nomes e estruturas das poliaminas (Kusano, Berberich et al. 2008)

As poliaminas encontram-se em vários órgãos incluindo o sistema nervoso central (CNS), onde têm uma distribuição específica (Yatin 2002). Foram localizadas em células neuronais e em células da glia (Carter 1994) e alguns estudos revelam uma maior produção de espermidina na matéria branca do cérebro (Shaw and Pateman 1973).

Altos níveis de poliaminas são encontradas no início do desenvolvimento do CNS (Chaudhuri, Choudhury et al. 1983) e as suas concentrações diminuem com a idade. A diminuição mais significativa verifica-se para a espermidina em todos os tecidos, a espermina diminui apenas na pele, coração e músculos e a putrescina existe sempre a baixas concentrações em todas as idades (Minois, Didac et al. 2011). As alterações no metabolismo das poliaminas, nomeadamente o aumento da actividade das enzimas e a acumulação de putrescina, resultam em lesões no CNS. No entanto, o preciso envolvimento das poliaminas ainda não é bem conhecido (Adibhatla, Hatcher et al. 2002). As poliaminas também se encontram na urina e no plasma a baixas concentrações e podem difundir-se do CNS para o LCR (Luccarelli, Ferioli et al. 1987). No cérebro humano adulto, em condições fisiológicas normais, as poliaminas encontram-se no LCR às seguintes concentrações: a putrescina apresenta valores de 0.13 ± 0.02 nM, a cadaverina de 2.12 ± 1.48 nM, a espermidina de 0.12 ± 0.01 nM (Paik, Ahn et al. 2010) e a espermina de 0.14 ± 0.01 uM (<http://www.hmdb.ca>).

5.2. Síntese de poliaminas

Com algumas variações, as vias biossintéticas para a poliaminas são conservadas nas bactérias, animais e plantas (Kusano, Berberich et al. 2008) .

A putrescina é sintetizada a partir da ornitina por uma reacção catalisada pela ornitina-descarboxilase (ODC), enzima limitante na síntese de poliaminas. A espermina e a espermidina derivam de putrescina pela junção sucessiva de dois grupos propilamina através da ação das respectivas aminopropil-transferases, espermidina e espermina sintase. Esta via é limitada pela disponibilidade do aminoácido metionina, uma vez que constitui o precursor da S-adenosil-metionina (SAM). A SAM através da ação da SAM-descarboxilase origina o dador de propilamina, a S-adenosil-S-metilhomocisteína (Moinard, Cynober et al. 2005). A cadaverina é sintetizada pela lisina através da lisina descaborxilase (Kusano, Berberich et al. 2008).

5.3. Catabolismo de poliaminas

As poliaminas espermina e espemidina podem ser convertidas de novo a putrescina através da espermidina/espermina N1-acetiltransferase (SSAT), enzima limitante no catabolismo das poliaminas. Depois de serem acetiladas são transferidas para o peroxissoma, onde são oxidadas pela poliamina oxidase (PAO) a putrescina com a formação de peróxido de hidrogénio e acetaminopropanal.

A espermina pode ainda ser convertida a espermidina pela espermina oxidase (SMO) no citoplasma. Ao contrário da SMO a PAO tem uma forte afinidade por substratos acetilados (Minois, Didac et al. 2011).

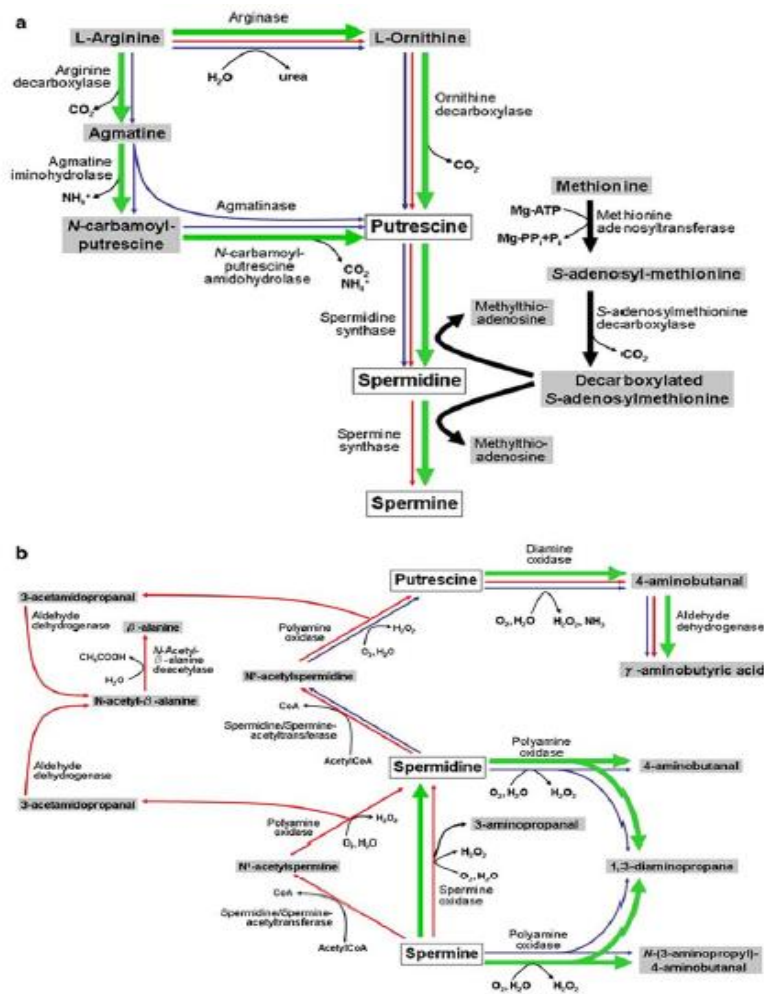


Figura 7: Percurso de biossíntese e degradação das poliaminas. a. Biossíntese; b. degradação. As seta a verde indicam o percurso de biossíntese e degradação de poliaminas nas plantas, as setas a azul na bactérias e as setas a vermelho nos animais (Kusano, Berberich et al. 2008).

5.4. Função

5.4.1. Proliferação celular e regulação da expressão génica

Devido à estrutura catiónica das poliaminas elas ligam-se fortemente ao DNA, estabilizando-o através da neutralização das cargas negativas dos grupos fosfato, diminuindo a repulsão entre cadeias (Moinard, Cynober et al. 2005).

Também influenciam a síntese de proteínas em várias etapas pois influenciam a estrutura secundaria do mRNA, tRNA e rRNA. Além disso, as poliaminas ligam-se aos ribossomas e facilitam a associação das subunidades ribossomais, e aumentam a actividade de transcrição e transdução (Yerlikaya and Stanley 2004).

5.4.2. Indução da apoptose celular

Um aumento excessivo de poliaminas pode promover a apoptose, pois pode levar a um stresse oxidativo aquando da acumulação de peróxido de hidrogénio proveniente do catabolismo através da enzima PAO (Moinard, Cynober et al. 2005).

A espermina e espermidina ligam-se a locais específicos da membrana mitocondrial, regulando o transporte de cálcio. Pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, gera-se uma acumulação de cálcio, desencadeando a apoptose (Minois, Carmona-Gutierrez et al. 2011). No entanto também estão envolvidas na proliferação celular, uma vez que aumentam a expressão da fosfoproteína nuclear, p53. A p53 desempenha um papel importante na regulação de vários genes envolvidas no crescimento e na morte celular (Moinard, Cynober et al. 2005).

5.4.3. Regulação de canais iónicos

As poliaminas exercem também efeito sobre os canais iónicos e receptores através da regulação da homeostasia dos iões cálcio, sódio e potássio.

5.4.3.1. Receptores de glutamato

A espermina, e em menor extensão a espermidina, modulam os receptores dependentes de voltagem N-metil-D-aspartato (NMDA) (Pegg 2009). O NMDA é um receptor do glutamato, um neurotransmissor excitatório, e desempenha uma importante função na plasticidade sináptica (Berger and Noe 2003). A espermina através da ligação a um domínio extracelular do receptor NMDA, estimula o receptor por um aumento da corrente de glutamato e glicina (Pegg 2009). A espermina liga-se ao receptor NMDA num local distinto aos seus agonistas, potenciando a actividade do receptor por promover a ligação de bloqueadores de canais iónicos (Williams 1994).

Os receptores AMPA são responsáveis pela neurotransmissão excitatória rápida no CNS (Pegg 2009). As poliaminas são responsáveis por causar rectificação interna dos receptores AMPA e Kainato, bloqueando o receptor e impedindo o influxo de sódio e cálcio (Kusano, Berberich et al. 2008).

5.4.3.2. Canais Kir

Os canais Kir influenciam diversos processos como a contracção do músculo cardíaco, libertação de insulina a partir de células-β pancreáticas e desempenham um papel fisiológico em células excitáveis, onde regulam o potencial de repouso e o potencial de acção da membrana. Os canais de potássio rectificadores de influxo (kir) exibem acentuada actividade dependente de voltagem e são bloqueados por poliaminas (Kurata, Akrouh et al. 2013). Todas

as poliaminas ligam-se a estes canais, no entanto têm maior afinidade para a putrescina (Pegg 2009). Este mecanismo inibitório é essencial para os eventos subjacentes à excitação eléctrica, que de outra forma seria alterada pela significativa densidade de canais Kir presentes em muitas células excitáveis (Kurata, Akrouh et al. 2013).

II. Objectivo

Estudos anteriores revelaram a expressão dos genes de vários receptores olfactivos no plexo coróide através de microarrays de cDNA em ambos os sexos, sugerindo que esta via possa ser funcional neste epitélio.

O objectivo deste trabalho é investigar se a via de transdução olfactiva funciona no plexo coróide através de estudos de electrofisiologia, usando poliaminas como estímulo odorífico.

III. Material e Métodos

1. Animais

Neste estudo utilizaram-se ratos C57BL/6JRcchsd (colônia originária da Harlan Laboratories), machos e fêmeas, com idades entre o 1 mês e os 4 meses. Os animais foram tratados de acordo com as directrizes da União Europeia para o cuidado e manuseamento de animais de laboratório (Directiva 2010/63/UE).

2. DC Field Potential Electro-olfactograma (EOG)

O electro-olfactogram (EOG) é um método de gravação informativo, fácil de conduzir e confiável para analisar a função olfactiva ao nível do epitélio olfactivo. O potencial do campo mede a alteração do potencial eléctrico da membrana do epitélio olfactivo quando estimulados por substâncias específicas. Quanto menor a concentração necessária para provocar uma alteração de potencial eléctrico, maior a sensibilidade para com essa substância.

Esta metodologia, com algumas adaptações, foi adotada para medir a alteração do potencial eléctrico da membrana do CP, em cérebros de ratinho, imediatamente após a sua disseção. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Depois de retirado o cérebro, foi feito um corte paralelo à fissura longitudinal em ambos os hemisférios cerebrais para expor o interior do ventrículo lateral e os CPs.

O potencial do campo foi registado usando um amplificador e micropipetas de vidro cheias de NaCl 1M em 2% agar e introduzidos num suporte de microeléctrodos, com solução de KCl 3M, permitindo a ligação da ponte salina Ag/AgCl (PIP6, HEKA, Germany).

O eléctrodo de referência foi colocado perto da fissura longitudinal enquanto que o eléctrodo de registo foi colocado na superfície do plexo coróide. O LCR artificial (148 mM NaCl, 3,0 mM KCl, 1,5mM CaCl₂, 1,0mM MgCl₂, 1,4mM NaHPO₄, 5,56mM glucose, pH 7,4) e o estímulo foram administrados através de uma válvula de três vias. O plexo coróide foi continuamente irrigado com a solução de LCR a um fluxo a volta de 1,6 ml.min⁻¹. A irrigação foi mantida até ao final da experiência.

O eléctrodo de referência e o de registo estão conectados a um amplificador. Os sinais de voltagem são amplificados) através de um pré-amplificador DC (NL102, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Reino Unido) e subsequentemente filtrado acima dos 50 Hz (NL125, Digitimer Ltd.) e amplificado (NL106, Digitimer Ltd.) de modo a obter uma amplificação final de 1000x. O sinal foi então digitalizado (Digidata 1440A, Molecular Devices Ltd, Sunnyvale, CA, USA) e gravado no computador com um software apropriado (Axoscope 9.2, Molecular Devices Ltd).

2.1. Estudo de estabilidade

Para testar a estabilidade da resposta ao estímulo da poliamina com o tempo foi utilizada a cadaverina a uma concentração de 7,5mM. O estímulo foi dado por um período de dez segundos, cada dez minutos, durante uma hora. Cada indução de estímulo foi espaçada por um intervalo dez minutos de modo a garantir a lavagem do plexo, evitando assim a tolerância ao estímulo.

2.2. Adição de estímulos

Para comparar a potência olfactiva das diferentes poliaminas e a relação de concentrações foram utilizadas quatro poliaminas: cadaverina, putrescina, spermina e spermidina (Sigma-Aldrich, Inc) a uma gama de concentrações de 0,2mM, 0,5mM, 1mM, 2mM, 5mM e 10mM. O estímulo de cada poliamina foi feito dois em dois minutos por um período de dez segundos e foram dados em ordem variável, mas sempre em ordem de concentração crescente. Foram ainda utilizados como odorantes o undecanal (Sigma-Aldrich, Inc) e bourgeonal (Enzo Life Sciences) às concentrações de 10mM e 5mM respectivamente.

2.3. Estudo de especificidade

No teste de especificidade foram usados os aminoácidos lisina (Sigma-Aldrich, Inc) e ornitina descarboxilase (Sigma-Aldrich, Inc) ambos a uma gama de concentrações de 0,2mM, 0,5mM, 1mM, 2mM, 5mM e 10mM. O estímulo foi feito de dois em dois minutos, por um período de dez segundos, em ordem de concentração crescente.

2.4. Estudos farmacológicos

Foi testado o papel dos segundos mensageiros PLC/IP₃ e adenil ciclase através dos respectivos inibidores U73122 (Sigma-Aldrich, Inc) e SQ 22,35 (Sigma-Aldrich, Inc). Cada ensaio foi realizado em 3 etapas. Na primeira etapa foi testada a resposta às poliaminas. Foram usadas as quatro poliaminas, cadaverina, putrescina, spermina e spermidina a uma concentração de 5mM. De seguida, a resposta às poliaminas foi registada na presença dos inibidores, sendo que foi utilizada uma concentração de 125µM de SQ 22,356 e uma concentração de 10µM de U73122 dissolvidos em DMSO. No final, as respostas às poliaminas foram registadas sem o agente farmacológico. Os estímulos foram feitos de dois em dois minutos por um período de dez segundos.

Foram ainda utilizados os inibidores tetracaína (Sigma-Aldrich, Inc) e L-cis-diltiazem (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para o estudo das vias de transdução, ambos a uma concentração de 1mM. A resposta às poliaminas foi medida antes, durante e sem a presença dos inibidores, usando o procedimento descrito acima.

3. Análise estatística

Aplicou-se o teste ANOVA unifactorial. Quando a análise de variância indicava diferenças, os resultados foram comparados com o controle usando o teste de Dunnett e Tukey. O nível de significância considerado foi de 5% (P menor 0,05). Para todos os testes estatísticos foi utilizado o software SigmaPlot 11.0.

IV. Resultados

1. Análise da viabilidade dos cérebros ex-vivo

Numa primeira fase, foi efetuado um pulso contínuo de odorante, separado por intervalos de tempo de 10, 20 30, 40, 50 e 60 minutos, de modo a verificar o tempo de actividade cerebral. Verificou-se que tanto nos machos (n=12) como nas fêmeas (n=16) o cérebro mantém-se viável e responde ao estímulos durante 1 hora.

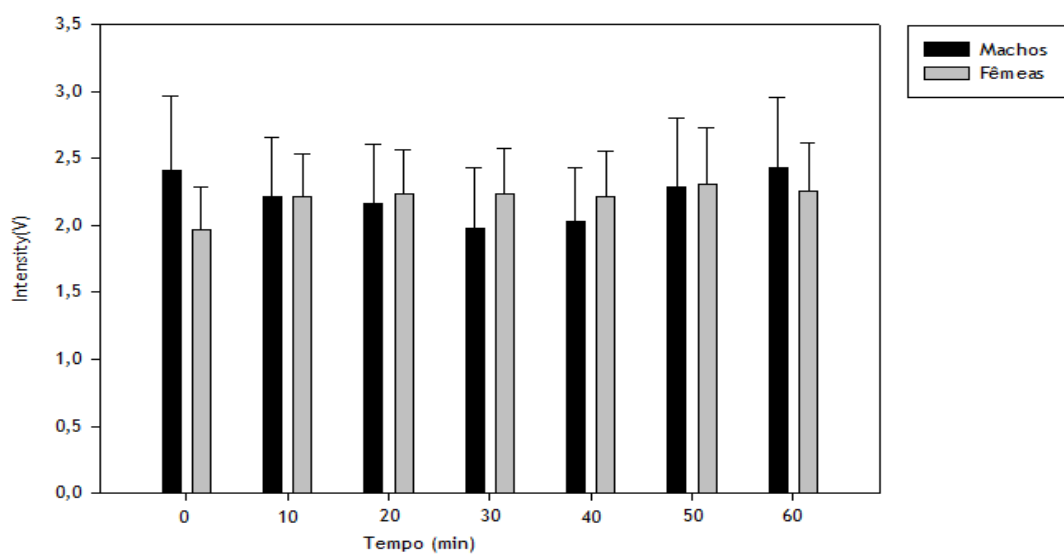


Figura 8: Time-course do CP ao tempo indicado após injeção com cadaverina a uma diluição de 1:1000. Dados expressos em média \pm s.e.m.

2. Respostas olfactivas às poliaminas

As respostas de EOG aos odorantes foram testadas usando as concentrações de 0,2mM a 1mM. Todas as poliaminas apresentaram uma resposta dependente da dose em ambos os sexos. As formas das curvas dose resposta foram semelhantes em todas as poliaminas excepto na putrescina, que exibiu uma resposta de voltagem negativa.

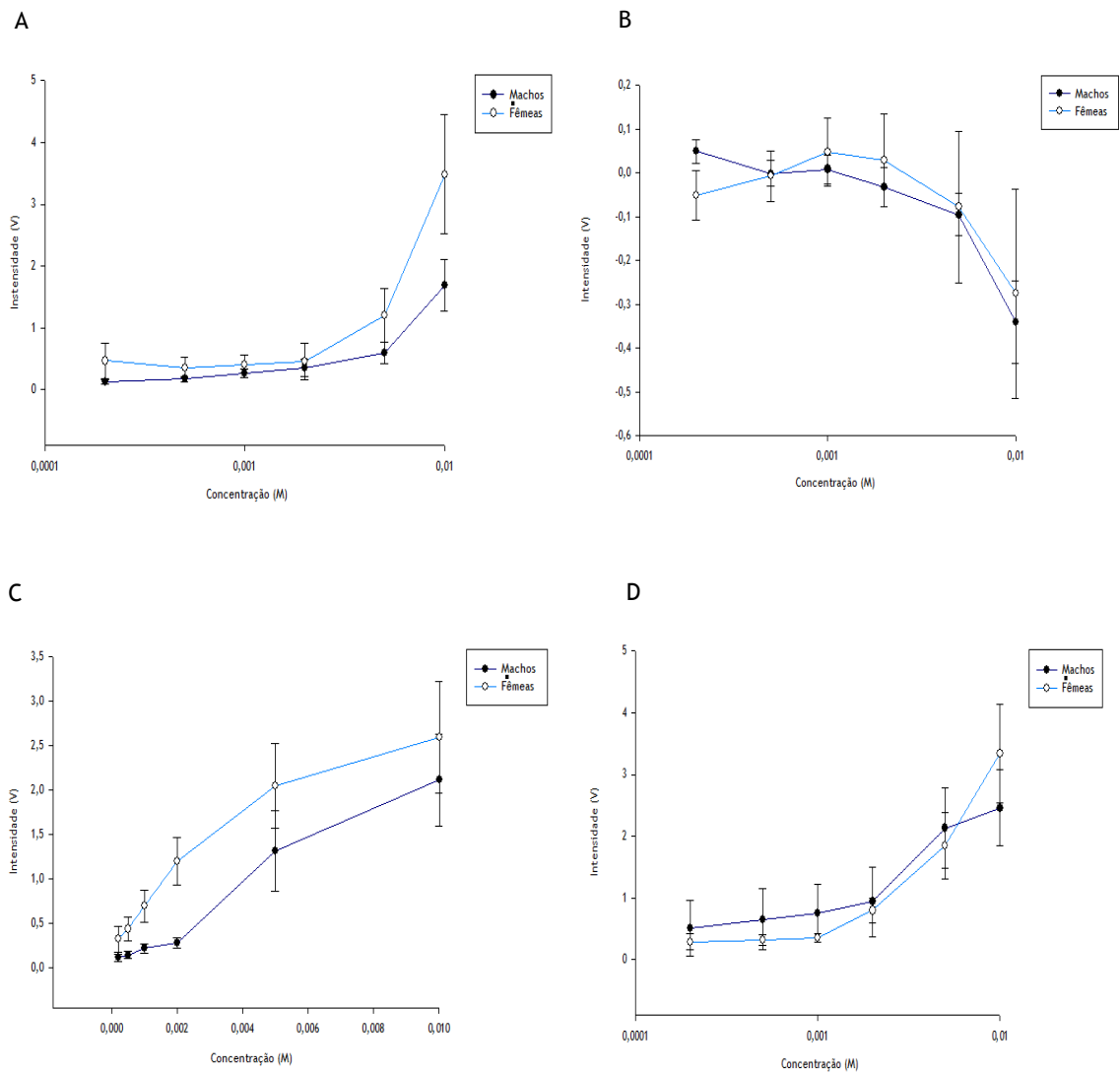


Figura 9: Relação dose resposta à poliamina cadaverina (A) (n machos = 13; n fêmeas =9), putrescina (B) (n machos = 13; n fêmeas =10), espermina (C) (n machos = 12; n fêmeas =10) e espermidina (D) (n machos = 10; n fêmeas =11). Dados expressos em média \pm s.e.m.

3. Estudo de especificidade

As figuras ilustram a relação dose resposta dos aminoácidos ornitina e lisina. A ornitina foi usada uma vez que é um precursor comum da putrescina, espermina e espermidina. A lisina foi usada pelo facto de ser o precursor da cadaverina e por conter o mesmo grupo amina que as poliaminas usadas. Consta-se que a resposta das fêmeas tanto na lisina como na ornitina é negativa e que nos machos é positiva.

Em relação à ornitina verifica-se um aumento consoante a concentração no sexo feminino embora esta não seja significativa. O mesmo se verifica nos machos com o aminoácido lisina.

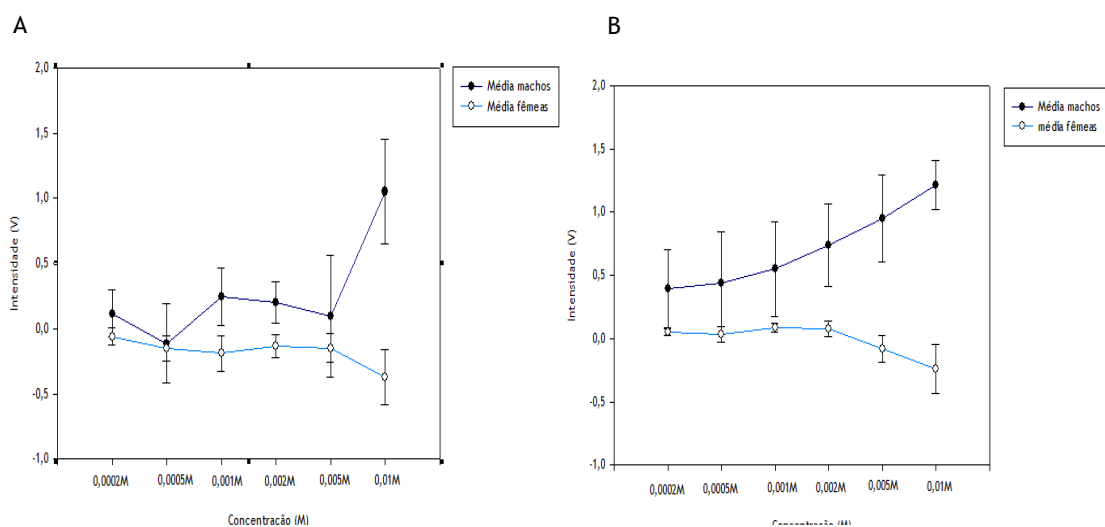


Figura 10: Relação dose resposta aos aminoácidos ornitina (A) (n machos = 4; n fêmeas = 8) e lisina (B) (n machos = 4; n fêmeas = 8). Dados expressos em média \pm s.e.m.

4. Análise das vias de transdução

Para a análise das vias de transdução utilizou-se como inibidor da fosfolipase C o fármaco U73122, como inibidor da Adenil ciclase o fármaco SQ22356 e como inibidor dos canais catiónicos nucleotídeos cíclicos, o fármaco tetracaína e o fármaco L-cis-Diltiazem. Foi seleccionada a concentração de 5mM para todas as poliaminas.

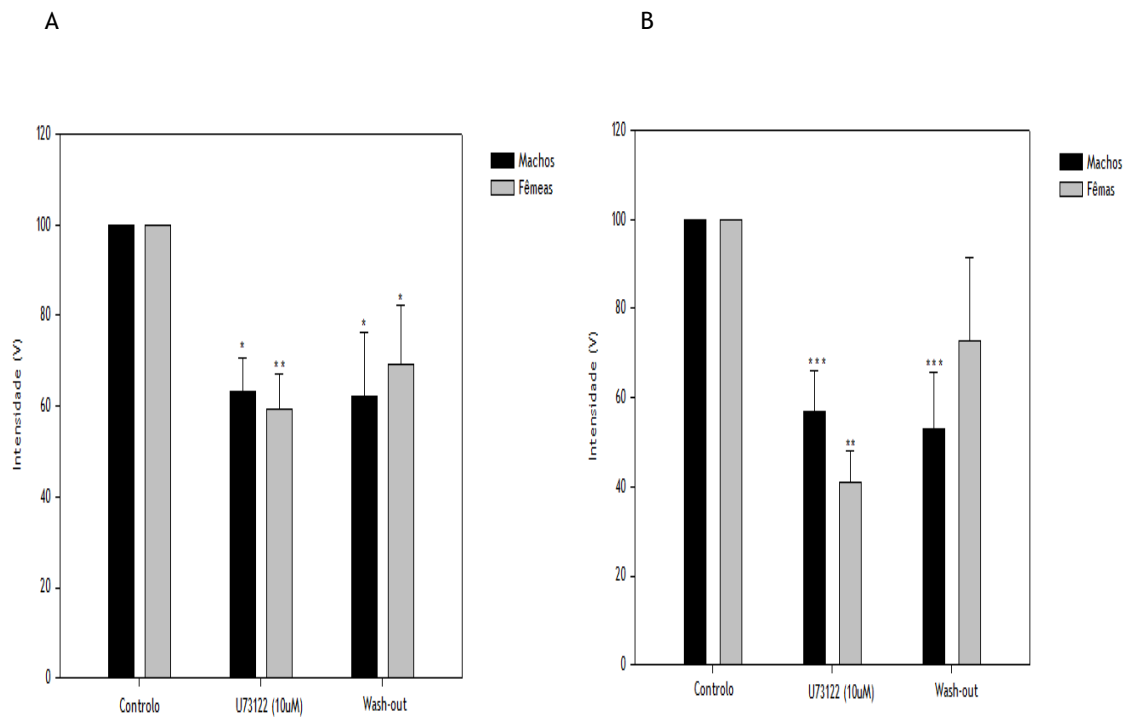
4.1. Inibidor U73122

Verificou-se uma diminuição na resposta em ambos os sexos em todas as poliaminas excepto na espermidina (Fig. 12). Na cadaverina as fêmeas apresentam uma maior inibição ($59,52 \pm 7,74$) em relação ao controlo do que os machos ($63,10 \pm 7,40$). Na putrescina o padrão foi semelhante, havendo também uma diminuição mais significativa nas fêmeas ($40,91 \pm 7,25$) em relação ao controlo do que nos machos ($57,04 \pm 9,05$). Pelo contrário, na espermina houve uma diminuição maior da resposta nos machos ($62,63 \pm 7,31$) em relação ao controlo do que

nas fêmeas ($73,48 \pm 1,66$). Constata-se ainda que nas fêmeas o sinal recupera após o tratamento com o inibidor.



Figura 11: Exemplos representativos de respostas Dc field potencial em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de U73122 10µM : (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.



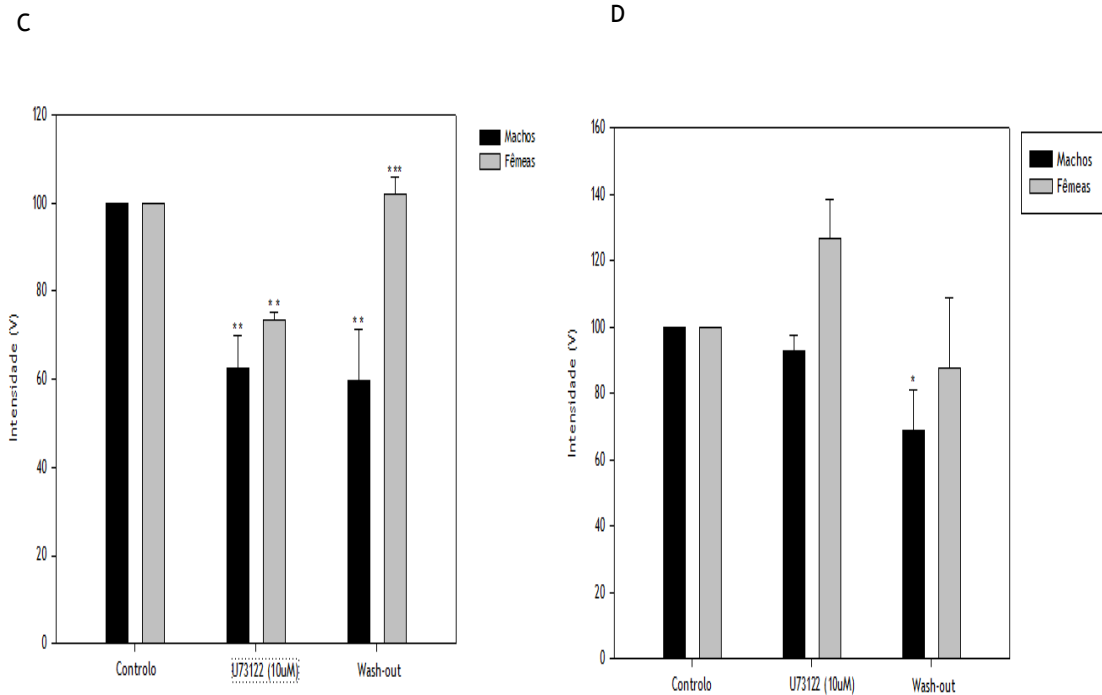


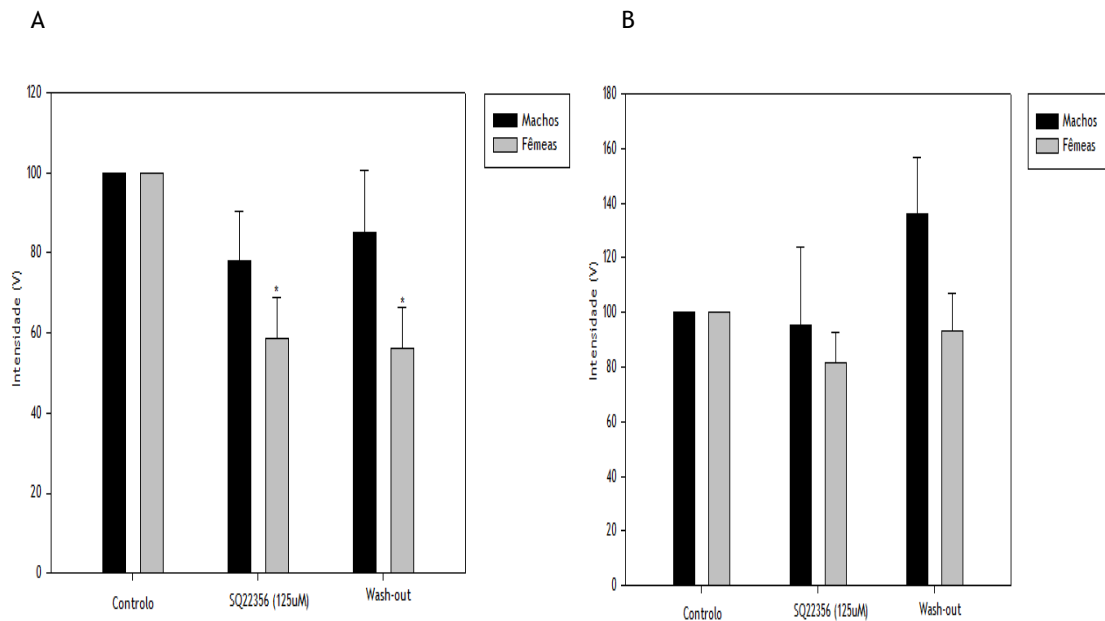
Figura 12: Respostas olfactivas das poliamina cadaverina (A) (n machos = 9; n fêmeas =7), putrescina (B) (n machos = 8; n fêmeas =7), espermina (C) (n machos = 8; n fêmeas =8) e espermidina (D) (n machos = 8; n fêmeas =7) com o uso do inibidor da fosfolipase C. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.em. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2. Inibidor SQ22356

Com o uso do fármaco SQ 22356 verifica-se uma diminuição da resposta em todas as poliaminas excepto na putrescina (Fig. 13) . A resposta da cadaverina em fêmeas com o inibidor ($58,62 \pm 10,44$) é estatisticamente diferente das respostas em relação ao controlo, assim como na espermina ($62,51 \pm 5,09$) e espermidina ($72,13 \pm 9,27$). Nos machos há uma inibição da resposta nas mesmas poliaminas mas sem diferenças estatísticas. O sinal recupera após o tratamento com o inibidor.



Figura 13: Exemplos representativos de respostas Dc field potencial em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de SQ22356 125 μ M: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.



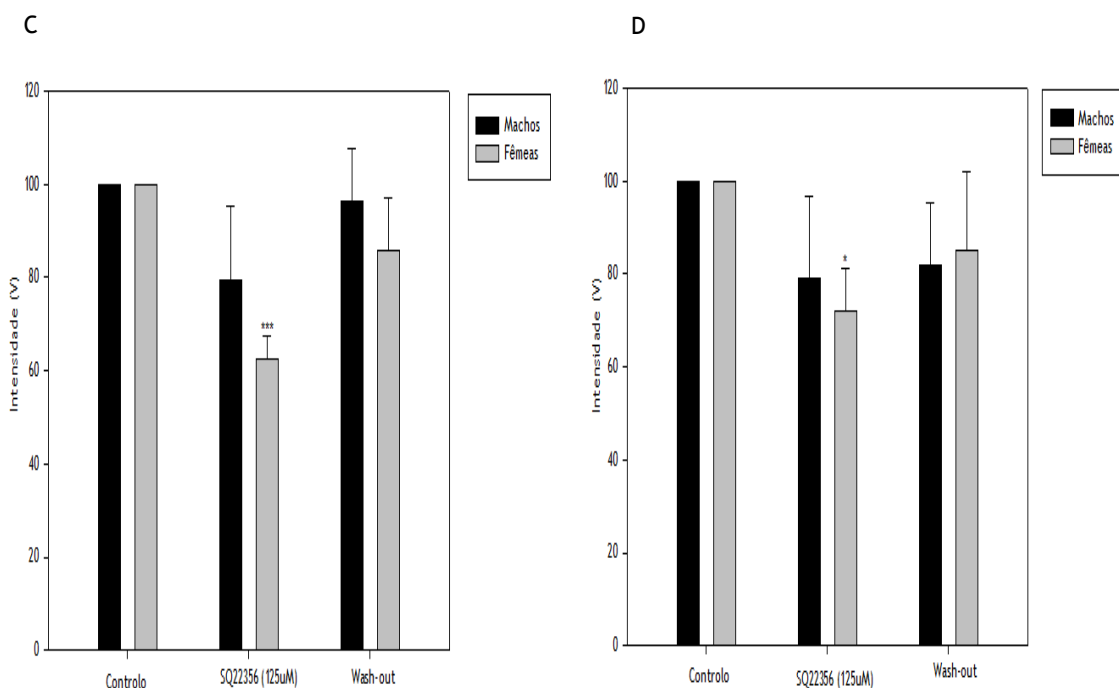


Figura 14: respostas olfativas das poliamina cadaverina (A) (n machos = 4; n fêmeas =4), putrescina (B) (n machos = 3; n fêmeas=3), espermina (C) (n machos = 4; n fêmeas =4) e espermidina (D) (n machos = 4; n fêmeas =4) com o uso do inibidor da adenil ciclase. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

4.3. Tetracaína

Constatou-se uma diminuição na resposta em ambos os sexos em todas as poliaminas excepto na putrescina, na presença de tetracaína. A resposta da cadaverina em fêmeas com o inibidor ($58,21 \pm 8,38$) é estatisticamente diferente das respostas em relação ao controlo, assim como em ratinhos do sexo masculino ($64,07 \pm 6,47$). A espermidina exhibe um padrão semelhante no qual as fêmeas ($61,52 \pm 7,97$) e os machos ($60,35 \pm 6,34$) exibem uma diminuição na resposta em relação ao controlo. Não houve discrepâncias no sexo masculino e feminino em relação à diminuição da resposta com a tetracaína na cadaverina e espermina. Na espermina houve uma diminuição significativa na resposta apenas no sexo masculino ($64,46 \pm 3,032$).

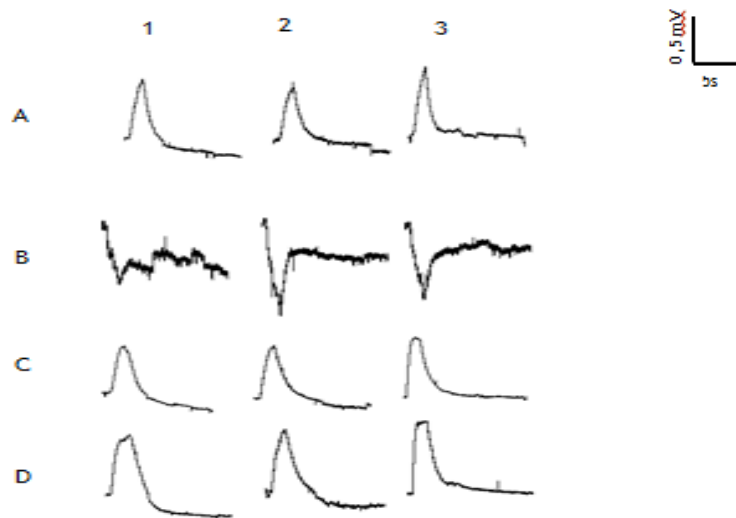
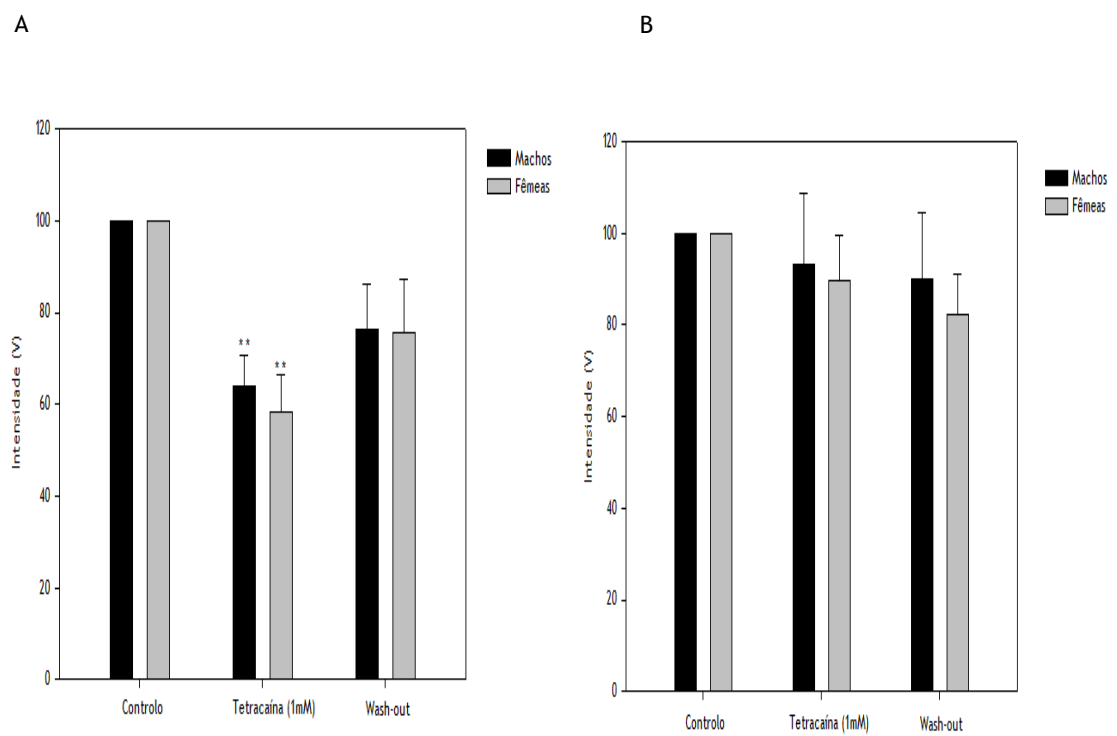


Figura 15: Exemplos representativos de respostas Dc field potencial em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de tetracaina 1mM: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.



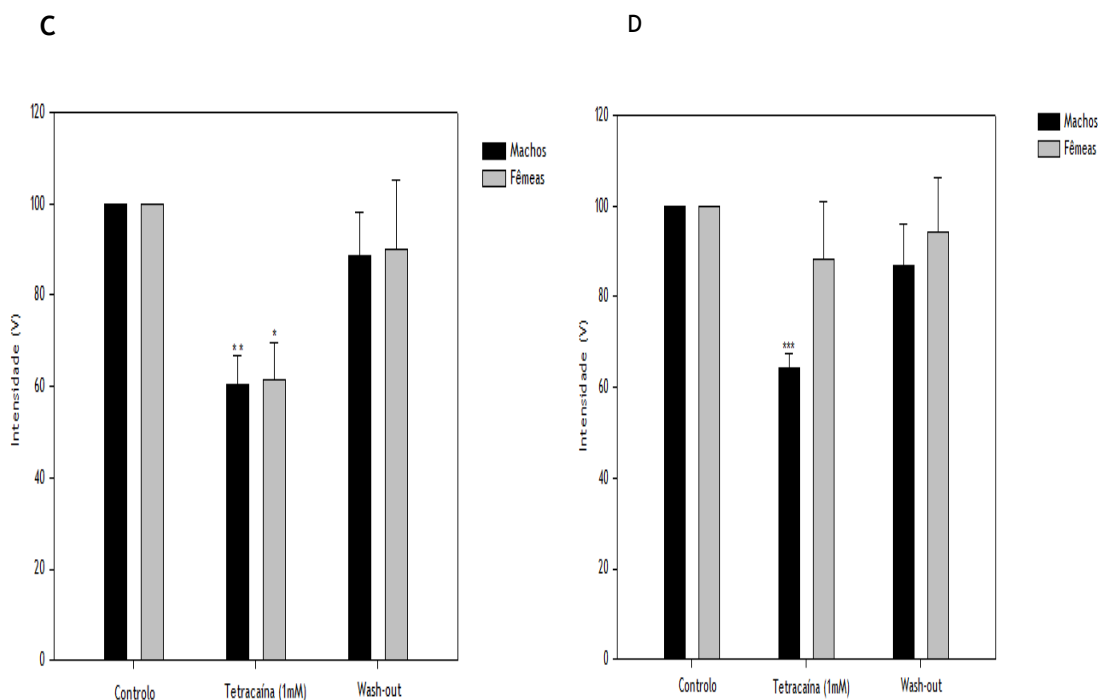


Figura 16: respostas olfactivas das poliamina cadaverina (A) (n machos = 8; n fêmeas =11) , putrescina (B) (n machos = 6; n fêmeas =10), espermina (C) (n machos = 8; n fêmeas =9) e espermidina (D) (n machos = 8; n fêmeas =12) com o uso do inibidor de CNG. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.4. L-cis-Diltiazem

Com o uso do inibidor L-cis-Diltiazem verificou-se uma diminuição na resposta em ambos os sexos em todas as poliaminas (Fig. 18). Na cadaverina os machos apresentam uma maior inibição ($59,52 \pm 7,74$) em relação ao controlo do que as fêmeas ($63,07 \pm 8,03$). O mesmo se verifica com a espermidina, havendo também uma diminuição mais significativa nos machos ($41,32 \pm 9,05$) em relação ao controlo do que nas fêmeas ($61,99 \pm 12,82$). Na espermina observa-se diferença estatística apenas nas fêmeas ($49,57 \pm 4,90$) em relação ao controlo. A putrescina exhibe uma inibição da resposta em ambos os sexos mas não significativa.

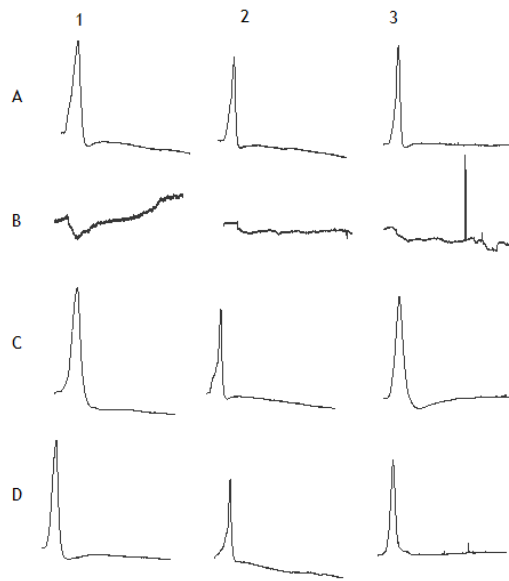
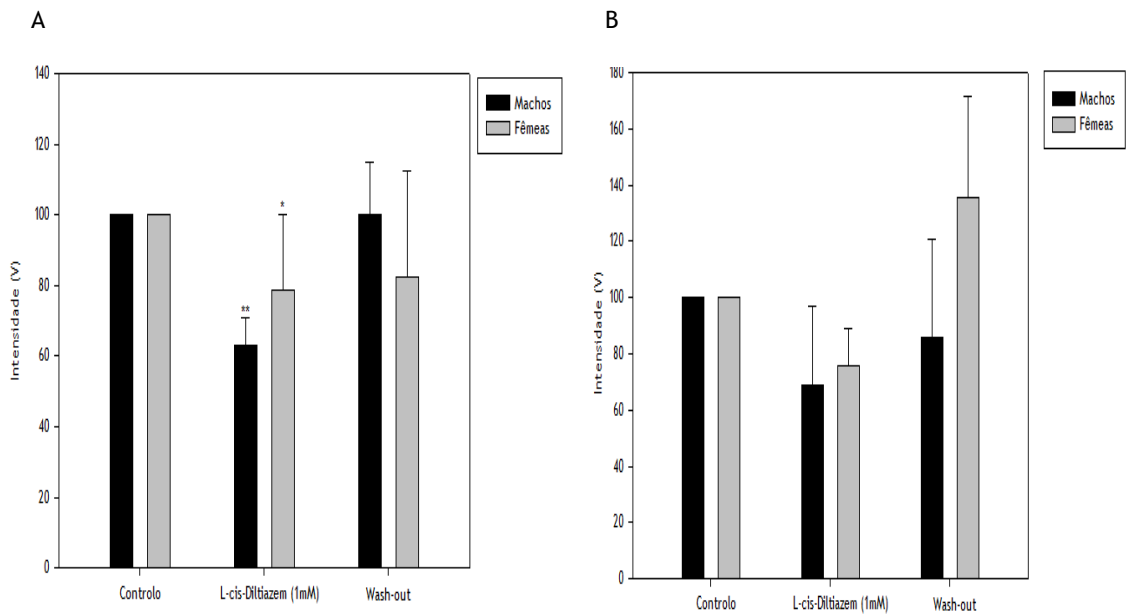


Figura 17: Exemplos representativos de respostas Dc field potential em machos antes (pré) (1), durante (tratamento) (2), e depois (lavagem) (3) da aplicação de solução de L-cis-Diltiazem 1mM: (A) Cadaverina, (B) Putrescina, (C) Espermina e (D) Espermidina. Os odorantes foram testados com concentrações iguais nas diferentes etapas.



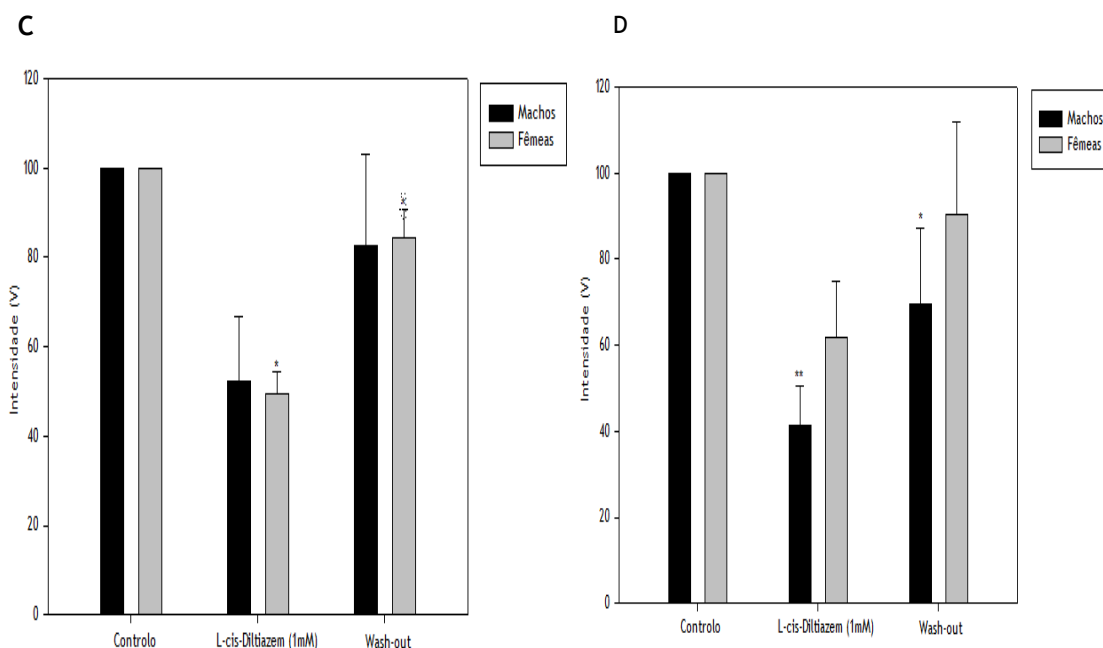


Figura 18: Respostas olfactivas das poliamina cadaverina (A) (n machos = 5; n fêmeas =7), putrescina (B) (n machos = 4; n fêmeas =4), espermina (C) (n machos = 5; n fêmeas =7) e espermidina (D) (n machos = 5; n fêmeas =8) com o uso do inibidor de CNC. Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5. Bourgeonal e undecanal

Através do bourgeonal e undecanal pretendeu-se averiguar se o plexo coróide responde a outros tipos de moléculas odoríferas e se existem outros tipos de canais de cálcio envolvidos. O gráfico demonstra que não há efeitos do bourgeonal em ambos os sexos e que o undecanal exerce efeitos inibitórios no sexo masculino em relação ao controlo.

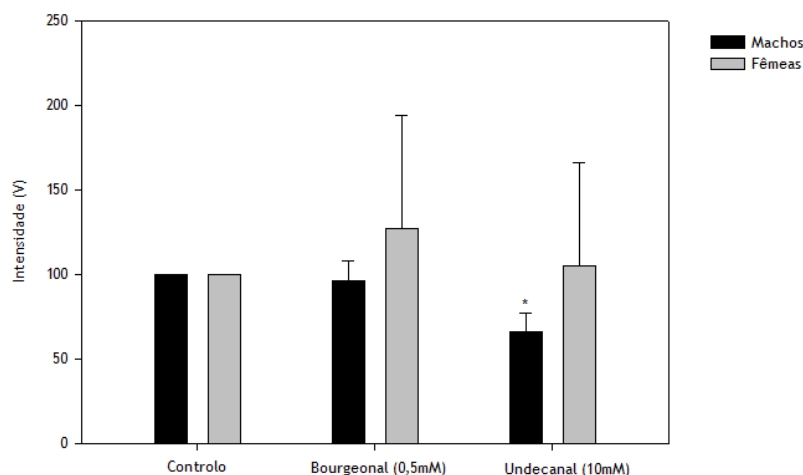


Figura 19: Respostas olfactivas aos odorantes bourgeonal (n machos = 7; n fêmeas =4) e undecanal (n machos = 6; n fêmeas =3). Dados expressos em percentagem e em média \pm s.e.m. Os asteriscos representam diferenças significativas. * = $p < 0,05$

V. Discussão

O CP é uma estrutura altamente vascularizada responsável pela produção de LCR a partir da secreção de água, iões e de macromoléculas (Falcao, Marques et al. 2012).

Vários OR foram identificados em tecidos não quimiossensoriais como nos testículos, língua, coração, baço, pâncreas, na placenta, no pulmão e nos rins (Kang and Koo 2012). Nestes tecidos a sua função ainda é desconhecida mas pensa-se ter funções sensoriais. Foram ainda demonstrados a presença de OR no CP através de estudo de microarrays de cDNA no CP. Um outro estudo realizado pelo nosso grupo de investigação, comprovou a presença das moléculas ACIII e Golf, moléculas essenciais para a via de transdução olfactiva, no epitélio do CP (Quintela, Gonçalves et al. 2013).

Os nossos resultados providenciam um primeiro estudo detalhado da análise das vias de transdução utilizadas pelo plexo coróide para reconhecimento do odor, a partir da técnica de electro-olfactograma. Quando um odorante activa um OR, é gerado um potencial de membrana negativo seguido de uma recuperação do potencial. Estes potenciais podem ser medidos usando eléctrodos posicionados perto do epitélio. A magnitude desse potencial é chamada de electro-olfactograma, que varia consoante a concentração de cada estímulo. O EOG tem a vantagem de poder ser medido durante algum tempo após a morte do animal ou depois de se aplicar um agente farmacológico que bloqueia a transmissão axonal dos OR (Doty 2009).

Inicialmente avaliou-se a duração da viabilidade do CP. Uma aplicação continua do mesmo estímulo, aplicado o longo do tempo, demonstrou que o cérebro se mantém viável por uma hora. Demonstrou também que não existe adaptação ao odor, uma vez que quando a amplitude da resposta diminui volta a recuperar no seguinte estímulo.

Para fazer o estudo da via olfactiva do CP utilizaram-se 4 poliaminas, a cadaverina, a putrescina, a espermina e a espermidina. Verificou-se que as diferentes poliaminas têm diferentes respostas olfactivas. A espermidina e a cadaverina exibiram uma maior amplitude de respostas o que demonstra maior afinidade para os receptores do plexo coróide. A putrescina exibiu baixas amplitudes olfactivas possivelmente devido ao facto de conter menos grupos amina na sua estrutura. Exibiu ainda uma resposta negativa, e observou-se que com o aumento da concentração de putrescina a voltagem da resposta diminui o que significa que o meio intracelular se torna mais negativo com o aumento da concentração.

Com o uso dos aminoácidos ornitina e lisina observou-se que a deflexão do sinal difere com o sinal das poliaminas pelo que permitiu demonstrar que a especificidade da resposta é relativa às poliaminas e não aos seus precursores. Para além disso constatou-se que os receptores olfactivos têm maior afinidade para as poliaminas e pouca afinidade para compostos estruturalmente similares. Assim sendo, pode se concluir que os receptores olfactivos do CP discriminam poliaminas de outros compostos com grupos amina.

Para determinar quais as vias de transdução utilizadas pelo CP foram usados 4 inibidores. O U73122, o SQ 22356, a Tetracaína e o L-cis-Diltiazem.

A PLC é uma enzima chave para a regulação da libertação de Ca^{2+} das reservas de IP3. O U73122 (1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) tem sido extensivamente usado como um inibidor farmacológico da PLC de modo a elucidar a importância desta enzima nas vias de transdução olfactiva (Wilsher, Court et al. 2007).

Com o uso deste inibidor constatou-se uma diminuição na resposta das poliaminas cadaverina, putrescina e espermina. No entanto na espermidina não se constataram efeitos, indicando que a activação da PLC não é necessária para a via de deteção desta poliamina.

O fármaco SQ22356, é um inibidor da Adenil ciclase e estudos anteriores demonstram que inibe a produção de AMPc em 80% em neurónios. Com o uso deste inibidor verificou se uma diminuição do sinal da cadaverina, espermina e espermidina apenas em fêmeas, indicando também a selectividade desta via de transdução.

Os CNG são canais não selectivos que permitem a passagem de catiões bivalentes em particular Ca^{2+} . Nas células fotorreceptoras dos neurónios da retina e nos neurónios sensoriais do epitélio olfactivos os CNG desempenham um papel fundamental na cascata de transdução de sinal, traduzindo uma alteração na concentração de nucleótidos cíclicos numa resposta eléctrica (Strassmaier, Uma et al. 2005). A tetracaína e o L-cis-Diltiazem bloqueiam os CNG pelo que o L-cis diltiazem bloqueia os canais de Ca^{2+} tipo L com maior afinidade do que a tetracaína. Com o uso da tetracaína verificou se uma diminuição da resposta nas poliaminas cadaverina, espermina e na espermidina apenas no sexo masculino. Com o uso do L-cis-Diltiazem verificou-se uma inibição da resposta na cadaverina, na espermina apenas nas fêmeas e na espermidina apenas nos machos.

Para se averiguar se o CP responde a outro tipo de moléculas odoríferas utilizou-se o bourgeonal e o undecanal. Estudos anteriores em esperma de ratos demonstraram que o bourgeonal leva ao influxo de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares, através do CatSper, o principal canal de cálcio. No esperma humano existem 4 tipos de canais que permitem o influxo de cálcio: os canais CatSper, os canais CNG, vários canais de voltagem activados por cálcio e canais de receptores de potencial transientes. Demonstraram ainda que o undecanal, outro odorante, funciona como um antagonista do bourgeonal, inibindo o influxo de Ca^{2+} (Brenker, Goodwin et al. 2012). No entanto não se constataram efeitos do bourgeonal do CP indicando a especificidade a odorantes e a existência de apenas CNG no epitélio que permita o influxo de Ca^{2+} .

Estes dados sugerem que a cascata de transdução olfactiva está ativa no CP. Observou-se que as vias da PLC, da AC e dos CNG são essenciais para o reconhecimento de poliaminas no plexo coróide. Verificou-se ainda que as 3 vias são específicas para certos odorantes e que o reconhecimento do sinal varia entre sexo tal como as vias de transdução variam consoante vários tipos de odorante. Os ORs não só funcionam como receptores de odorantes mas

também têm outras funções importantes na vigilância da composição LCR, assim sendo a transdução olfactiva nas células de CP poderá funcionar como um sistema de alerta e de proteção do SNC.

Bibliografia

- Ache, B. W. and J. M. Young (2005). "Olfaction: diverse species, conserved principles." Neuron **48**(3): 417-430.
- Adibhatla, R. M., J. F. Hatcher, et al. (2002). "Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats." Brain Res **938**(1-2): 81-86.
- Battal, B., M. Kocaoglu, et al. (2011). "Cerebrospinal Fluid Flow Imaging by Using Phase-Contrast MR Technique." The British Journal of Radiology **84**: 758-765.
- Berger, M. L. and C. R. Noe (2003). "Polyamine Regulation of the NMDA Receptor Complex as a Target in Drug Development." Medicinal Chemistry **3**: 51-64.
- Bim, C., M. Pinotti, et al. (2013). "Cerebrospinal Fluid Drainage Devices: Experimental Characterization." **12**(2): 59-62.
- Brenker, C., N. Goodwin, et al. (2012). "The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm." EMBO J **31**(7): 1654-1665.
- Carter, C. J. (1994). Neuropharmacology of Polyamines.
- Chaudhuri, D., I. Choudhury, et al. (1983). "Ontogeny of polyamines in relation to nucleic acids in brain and spinal cord of the developing human fetus." Brain Res **312**(1): 143-145.
- Chen, X., Z. Xia, et al. (2012). "Stimulation of electro-olfactogram responses in the main olfactory epithelia by airflow depends on the type 3 adenylyl cyclase." J Neurosci **32**(45): 15769-15778.
- Chouquet, B., P. Lucas, et al. (2010). "Molecular Characterization of a Phospholipase C β Potentially Involved in Moth Olfactory Transduction." Chemical Senses **35**(5): 363-373.
- Comar, A. R., N. A. Machado, et al. (2009). "Citological Analysis of Cerebrospinal Fluid." The Journal of the Biological Sciences **31**: 93-102.
- Damkier, H. H., P. D. Brown, et al. (2010). "Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport." Physiology (Bethesda) **25**(4): 239-249.
- De Palo, G., A. Boccaccio, et al. (2012). "A dynamical feedback model for adaptation in the olfactory transduction pathway." Biophys J **102**(12): 2677-2686.
- Doty, R. L. (2001). "Olfaction." Annual Review of Psychology **52**: 423-452.
- Doty, R. L. a. C., H. (2009). "The Neurology of Olfaction."
- Falcao, A. M., F. Marques, et al. (2012). "The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow!" Front Cell Neurosci **6**: 34.
- Flegel, C., S. Manteniotis, et al. (2013). "Expression Profile of Ectopic Olfactory Receptors Determined by Deep Sequencing." PLoS ONE **8**(2): e55368.
- Glatz, R. and K. Bailey-Hill (2011). "Mimicking nature's noses: from receptor deorphaning to olfactory biosensing." Prog Neurobiol **93**(2): 270-296.
- Ibanez-Tallon, I., A. Pagenstecher, et al. (2004). "Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation." Hum Mol Genet **13**(18): 2133-2141.
- Iran, I. D. (2009). Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice.
- Johanson, C., E. Stopa, et al. (2011). "The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread." Toxicol Pathol **39**(1): 186-212.
- Johanson, C. E., J. A. Duncan, 3rd, et al. (2008). "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease." Cerebrospinal Fluid Res **5**: 10.
- Kang, N. and J. Koo (2012). "Olfactory receptors in non-chemosensory tissues." BMB Rep **45**(11): 612-622.
- Kelly, E. (2013). "Time-Spatial Labeling Inversion for Cerebrospinal Fluid Flow Evaluation."
- Klasen, K., E. A. Corey, et al. (2010). "Odorant-stimulated phosphoinositide signaling in mammalian olfactory receptor neurons." Cell Signal **22**(1): 150-157.
- Kurata, H. T., A. Akrouh, et al. (2013). "Scanning the topography of polyamine blocker binding in an inwardly rectifying potassium channel." J Biol Chem **288**(9): 6591-6601.

- Kusano, T., T. Berberich, et al. (2008). "Polyamines: essential factors for growth and survival." Planta **228**(3): 367-381.
- Lapid, H. and T. Hummel (2013). "Recording odor-evoked response potentials at the human olfactory epithelium." Chem Senses **38**(1): 3-17.
- Lledo, P. M., G. Gheusi, et al. (2005). "Information processing in the mammalian olfactory system." Physiol Rev **85**(1): 281-317.
- Lledo, P. M., A. Saghatelian, et al. (2004). "Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function." Neuroscientist **10**(4): 292-303.
- Lowery, L. A. and H. Sive (2009). "Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system." Bioessays **31**(4): 446-458.
- Luccarelli, G., M. E. Ferioli, et al. (1987). Levels of Polyamine Biosynthetic Decarboxylase Activities as Indicators of the Degree of Malignancy of Human Primary Central Nervous System Tumors. Brain Oncology Biology, diagnosis and therapy. M. Chatel, F. Darcel and J. Pecker, Springer Netherlands. **52**: 129-133.
- Makino, N., S. Ookawara, et al. (2009). "The Morphological Change of Supporting Cells in the Olfactory Epithelium after Bulbectomy." Chemical Senses **34**(2): 171-179.
- Meeker, R. B., K. Williams, et al. (2012). "Cell trafficking through the choroid plexus." Cell Adhesion & Migration **6**(5): 390-396.
- Melo, E. L. A., M. R. T. Garcia, et al. (2003). "Lesões expansivas do plexo coróide." Radiologia Brasileira **36**: 379-384.
- Minois, N., D. Carmona-Gutierrez, et al. (2011). "Polyamines in aging and disease." Aging (Albany NY) **3**(8): 716-732.
- Minois, N., C. Didac, et al. (2011). "Polyamines in Aging and Disease." Aging (Albany NY) **3**(8): 1-16.
- Moinard, C., L. Cynober, et al. (2005). "Polyamines: metabolism and implications in human diseases." Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland) **24**(2): 184-197.
- Moinard, C., L. Cynober, et al. (2005). "Polyamines: metabolism and implications in human diseases." Clin Nutr **24**(2): 184-197.
- Paik, M. J., Y. H. Ahn, et al. (2010). "Polyamine patterns in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy." Clin Chim Acta **411**(19-20): 1532-1535.
- Pegg, A. E. (2009). "Mammalian polyamine metabolism and function." IUBMB Life **61**(9): 880-894.
- Pietzsch-Rohrschneider, I. (1980). "[The development of epiplexus cells (Kolmer cells) in the choroid plexus of the fourth ventricle of the mouse. A scanning and transmission electron microscopic study]." Z Mikrosk Anat Forsch **94**(2): 316-326.
- Powers, W. (2004). The Science of Smell.
- Quintela, T., I. Gonçalves, et al. (2013). "Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays." PLoS ONE **8**(4): e60199.
- Rawson, N. E. and K. K. Yee (2006). "Transduction and coding." Adv Otorhinolaryngol **63**: 23-43.
- Redzic, Z. (2011). "Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences." Fluids Barriers CNS **8**(1): 3.
- Sakka, L., G. Coll, et al. (2011). "Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid." Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis **128**(6): 309-316.
- Schroten, M., F.-G. Hanisch, et al. (2012). "A Novel Porcine *In Vitro* Model of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier with Strong Barrier Function." PLoS ONE **7**(6): e39835.
- Segal, M. (2000). "The Choroid Plexuses and the Barriers Between the Blood and the Cerebrospinal Fluid." Cellular and Molecular Neurobiology **20**(2): 183-196.
- Serot, J. M., J. Zmudka, et al. (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.
- Shah, P. and E. Swiatlo (2008). "A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens." Mol Microbiol **68**(1): 4-16.
- Shaw, G. G. and A. J. Pateman (1973). "The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain." J Neurochem **20**(4): 1225-1230.
- 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.

- 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.
- Spuch, C. and E. Carro (2011). "The p75 neurotrophin receptor localization in blood-CSF barrier: expression in choroid plexus epithelium." BMC Neurosci **12**: 39.
- Strassmaier, T., R. Uma, et al. (2005). "Modifications to the tetracaine scaffold produce cyclic nucleotide-gated channel blockers with widely varying efficacies." J Med Chem **48**(18): 5805-5812.
- Tyler, W. J., G. C. Petzold, et al. (2007). "Experience-dependent modification of primary sensory synapses in the mammalian olfactory bulb." J Neurosci **27**(35): 9427-9438.
- Veening, J. G. and H. P. Barendregt (2010). "The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid; a review." Cerebrospinal Fluid Res **7**: 1.
- Williams, K. (1994). Biology of the NMDA Receptor.
- Wilsher, N. E., W. J. Court, et al. (2007). "The phosphoinositide-specific phospholipase C inhibitor U73122 (1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) spontaneously forms conjugates with common components of cell culture medium." Drug Metab Dispos **35**(7): 1017-1022.
- Yatin, M. (2002). "Polyamines in Living Organisms." Journal of Cell and Molecular Biology **1**: 57-67.
- Yerlikaya, A. and B. A. Stanley (2004). "S-adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26 S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination." J Biol Chem **279**(13): 12469-12478.