

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/48707

IB/ 81751

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA



REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE
ANDRÓGENOS:
CONSERVAÇÃO OU DIVERGÊNCIA?

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniela Farias Cabral
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Daniela Farias Cabral".

ALUNA: DANIELA FARIAS CABRAL

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CHRISTINE HACKEL

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. SILVANA BORDIN

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS (UNICAMP) PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
GENÉTICA HUMANA E MÉDICA.

CAMPINAS, 2001

UNIDADE	I.B./817/S1
Nº CHAMADA	UNICAMP C112r
V	E
TOMBO BC	48707
PROC.	16.537/02
C	<input type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/02
Nº CPD	

CM00166906-9

8117

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C112r

Cabral, Daniela Farias

Região promotora do gene do receptor de andrógenos: conservação ou divergência?/Daniela Farias Cabral. -- Campinas, S.P:[s.n.], 2001.

Orientadora: Christine Hackel

Co-Orientadora: Silvana Bordin

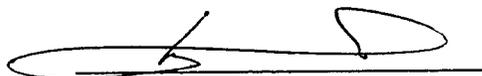
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Andrógenos. 2. Vetebrados. 3. Região promotora. I. Hackel, Christine. II. Bordin, Silvana. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.Título.

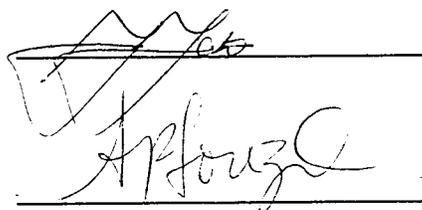
Defesa Pública: Campinas, 03 de dezembro de 2001

Banca Examinadora:

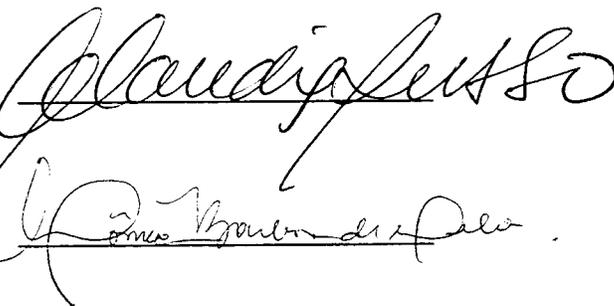
Profa. Dra. Christine Hackel (Orientadora)



Profa. Dra. Ana Maria Lima Azeredo-Espin



Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Profa. Dra. Cláudia Augusta de Moraes Russo

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Membros Suplentes:

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Quem te ensinou a nadar,
Quem te ensinou a nadar,
Foi, foi marinheiro,
Foi o peixinho do mar...

Encontros e Despedidas
Milton Nascimento / Fernando Brant

Mande notícias do mundo de lá
Diz quem fica.
Me dê um abraço, venha me apertar
Estou chegando.
Coisa que gosto é poder
Partir sem ter planos.
Melhor ainda é poder voltar
Quando quero.
Todos os dias é um vai e vem
A vida se repete na estação
Tem gente que chega pra ficar
Tem gente que vai pra nunca mais
Tem gente que vem - quer voltar
Tem gente que vai - quer ficar
Tem gente que veio só olhar
Tem gente a sorrir e a chorar.
E assim, chegar e partir são só
Dois lados da mesma viagem.
O trem que chega é
O mesmo trem da partida
A hora do encontro é também
Despedida.
A plataforma dessa estação
É a vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa Dra Christine Hackel, por todos estes anos de orientação, amizade e confiança;

À minha co-orientadora Silvana Bordin, por ter me incentivado a começar este trabalho;

Aos membros que compõe esta banca: Profa Dra Mônica Melo, Profa Dra Cláudia Russo, Profa Dra Anete Pereira de Souza e Profa Dra Ana Maria Azeredo Espin;

Aos membros que compuseram o pré-exame deste trabalho: Profa Dra Cláudia Russo, Profa Dra Carmen Bertuzzo, e Prof Dr Celso Benedetti, por suas valiosas críticas e sugestões;

Aos pesquisadores do Instituto Oceanográfico da USP, em particular o Prof. Dr. Roberto Ávila, que viabilizaram o meu embarque para a coleta do peixe primitivo, um dos objetos deste estudo;

Aos pacientes e doadores de sangue, por cederem o material biológico necessário à extração de DNA, possibilitando a realização de parte deste estudo;

Às secretárias do CBMEG: Tânia, Sandra, Fabiana e Patrícia, por estarem sempre facilitando a nossa vida! Muito obrigada mesmo!

Ao Anderson e Andréa, por todo cuidado e critério usados no seqüenciamento automatizado das amostras da tese;

Ao pessoal do Laboratório de Genética Humana: Maricilda, Edi, Juliana, Junia, Lucy, Ericka, Frau, Camila, Eliana, Fernanda, Marcelo, Andrey (os membros do MA Design), Eduardo, Marta, Raquel, Fer II, Tiago, Osmar e Hamilton;

À Madá, pelo seu riso largo e fácil, pelo seu carinho e eterna disposição em nos ensinar a aprender;

À Edizinha, grande amiga que me recebeu em sua casa nesses meses finais campineiros com alma e coração abertos. Obrigadinha, viu?!

À Juli e Sandrinha, por me ajudarem a crescer como profissional e como ser humano. Duas queridas amigas que já deixaram profundas marcas na minha vida!

À Ericka, que na falta das minhas irmãs pra brigar... hehehe

Ao casal musical, Josani e Marcelo, pela confiança incondicional;

Aos amigos do Rio, cuja distância só fez com que os laços de amizade se fortalecessem: Martinha, Paty, Ary, Adriana, Léo, Mariana e Klinger;

Aos amigos que cruzaram o meu caminho nesse dez anos de Campinas: Júnia, Cleber, Lucy, Marcela, Fabiana, Juli, San, Ed, Pät, Edwin, Alex, Andréa e Lima, Sandra, Michele, Bel, Arno, Lee, Eneida, Ivy, Henrique, Felipe, Ângela, Nathaly, Dri Capella, Alba, Lú, Lú Paulino, Jonatas, Érika, Mara, Zé Carlos, Dri, Mônica, Zé Paulo, Dani Bassères, Eduardo, Tereza, Nilma, Tereza Lima, Dani Fachin, Carlos Steiner, Carlos Biasi, Andrea Fissore, Roberta, Pat Ucelli, Ephraim, Marcos, Juliana Karina, Yara, Roberto, Fabiano, Ma, Pedro, Marlene, Cynthia e Carla.

"Coisas que acontecem deixa que eu lhe diga, nada me cansou, não senti fadiga porque gente amiga só me traz calor. Se eu tô indo embora não vai ser agora que se vai sofrer. Deixa que mais tarde, na curva da estrada, a gente se vê. Se eu deixo a saudade, vou levar também. Ter que ir embora, todo mundo tem..." *Almir Sater & Renato Teixeira*

E finalmente, agradecer à minha família, que tanto sofreu com a minha vinda para Campinas, mas que agora também não esconde a felicidade com a minha volta às origens. Graça, Isadora, Andreza, Bárbara, Plínio e Luciano: vocês são o meu eterno porto seguro, a minha força-motriz na tentativa de, a cada dia, me tornar um ser humano melhor.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

μCi – micro Curie

μg - micrograma

μl - microlitro

μM – micromolar

2YT – meio de cultura contendo extrato de levedura e triptona

5' UTR – *5' untranslated region* (região 5' não traduzida)

aAR – iniciador (descrito por YOUNG *et al.*, 1995) para amplificar o gene *RA* em animais

Ap1 – sítio de ligação à proteína Ap1

AREs – *Androgen Response Elements* (Elementos Responsivos aos Andrógenos)

AMV reverse transcriptase – *Avian Myeloblastosis virus* transcriptase reversa

BAP – Bisacriloilpiperazina

CaP – Câncer de Próstata

cDNA – DNA complementar

Ci - Curie

cm – centímetro

CpG – regiões do genoma ricas em guanina e citosina

CPM – *Count per Minute*

CRE-cAMP- elemento responsivo ao AMP cíclico

CSGE – *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*

ddNTP – didesoxinucleotídeos

DEPC - dietilpirocarbonato

DH5 α - cepa da bactéria *E. coli*

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeos

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitidina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

dTTP - desoxitimina trifosfato
DO – Densidade Ótica
DTT - Ditionitrito
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
GSP – *Gene Specific Primer*
HCl – ácido clorídrico
hRA – Gene do Receptor de Andrógenos humano
Kb - Quilo base
LB – meio de cultura *Luria-Bertani*
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
mg- miligrama
min- minutos
mL- mililitro
MMLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*
MOPS – ácido propanosulfônico 3-N-Morfolino
NaAc – Acetato de Sódio
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
ng- nanograma
nm- nanômetro
pb - pares de bases
PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PM – Peso Molecular
pMol - picomol
RA – Receptor de Andrógenos
RACE – *Rapid Amplification of cDNA Ends*
RNA - ácido ribonucléico
RNase – enzima degradadora de RNA
RNasin – enzima que protege o RNA de degradação
rpm - rotações por minuto

rsAR – *red stream Androgen Receptor* (par de iniciador descrito por TOUHATA *et al.*, 1999)

RT – *Reverse Transcriptase*

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SM – meio contendo sulfato de magnésio

SSC – Sal de Citrato de Sódio

SSCP – *Single Strand Conformation Polymorphism*

Sp1 – sítio de ligação à proteína Sp1

TA – Temperatura Ambiente

TAE – Tris – ácido acético - EDTA

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE – Tris – Borato – EDTA

TE- Tris - EDTA

TEMED - N,N,N',N' – Tetrametiletilenodiamina

TENS – TE – NaOH – SDS

TIS – *Transcription Initiation Sites* (Sítios de Início de Transcrição)

T_m - Temperatura de fusão (*melting*)

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

TTE – Tris – Taurina - EDTA

U - unidades

V – volts

Vhs – Volt hora

v/v – volume a volume

W - watts

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo

SUMÁRIO

RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxv
INTRODUÇÃO	3
A) ASPECTOS EVOLUTIVOS	3
B) REGIÃO PROMOTORA	11
C) ESTUDO DE UM VERTEBRADO PRIMITIVO DA CLASSE AGNATHA: <i>EPTATRETUS SP.</i>	15
OBJETIVOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	25
1) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM HUMANOS	25
A) CASUÍSTICA	25
B) COLETA DE SANGUE PARA A CRIAÇÃO DE BANCO DE DNA	25
C) EXTRAÇÃO DE DNA	25
D) AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA	26
E) DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS	29
1) SSCP	29
2) CSGE	30
F) SEQÜENCIAMENTO MANUAL	33
2) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA (CAP)	34
A) CASUÍSTICA	34
B) AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RA EM PACIENTES COM CAP	34
3) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM VERTEBRADOS	35
A) AMOSTRAS	35
B) AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA	36
C) SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO	38

4) ISOLAMENTO DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E SUA REGIÃO PROMOTORA EM <i>EPTATRETUS SP.</i>	39
A) EXTRAÇÃO DE RNA	40
B) NORTHERN BLOT	41
C) TRANSCRIÇÃO DE RNA	46
D) RACE	46
E) EXTRAÇÃO DE DNA	48
F) CURVA DE CINÉTICA DE DIGESTÃO PARCIAL DE DNA GENÔMICO	49
G) PREPARO DO COSMÍDEO LAWRIST 4	50
H) CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA EM COSMÍDEO LAWRIST 4	51
I) SOUTHERN BLOT	53
J) MINI BANCO CONSTRUÍDO COM DNA DIGERÍDO COM <i>Pvu II</i>	55
K) ISOLAMENTO DE BANDA-SOUTHERN / PCR / CLONAGEM COM PGEM T EASY	58
RESULTADOS	63
1) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM DOADORES DE SANGUE	63
2) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM PACIENTES COM CAP	69
3) ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM VERTEBRADOS	71
4) ISOLAMENTO DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E SUA REGIÃO PROMOTORA EM <i>EPTATRETUS SP.</i>	74
DISCUSSÃO	81
A) REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM HUMANOS	81
B) REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM VERTEBRADOS	86
C) ISOLAMENTO DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E SUA REGIÃO PROMOTORA EM <i>EPTATRETUS SP.</i>	91

CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO I	109
ARTIGO SUBMETIDO	119

Resumo

RESUMO

O receptor de andrógenos é responsável por mediar a resposta fisiológica à testosterona e à dihidrotestosterona, tendo um papel fundamental no processo de desenvolvimento sexual e manutenção dos caracteres sexuais masculinos.

O gene que codifica o receptor de andrógenos tem uma região 5' não transcrita relativamente longa, o que sugere que a seqüência à jusante dos sítios de início de transcrição seja necessária à sua expressão. Uma importante característica deste gene é a ausência das seqüências nucleotídicas TATA e CCAAT, consideradas elementos promotores mínimos necessários à transcrição em eucariotos.

A análise de seqüências de regiões promotoras em eucariotos vem revelando a existência de polimorfismos que podem estar envolvidos com o nível de expressão gênica, atenuando ou amplificando tal expressão. Tal fenômeno leva à indagação sobre o significado dessas variações nucleotídicas na introdução de alterações funcionais que resultem em mudanças evolutivas da fisiologia, desenvolvimento e morfologia dos organismos superiores.

Deste modo, o presente trabalho teve por objetivos específicos: (i) a verificação da existência de polimorfismos na região promotora do gene do receptor de andrógenos em indivíduos doadores de sangue da população normal, bem como em pacientes portadores de câncer de próstata (CaP) por SSCP, CSGE e seqüenciamento manual, e (ii) a análise da seqüência nucleotídica da região promotora do gene do receptor de andrógenos em 5 espécies de vertebrados, entre os quais um primitivo, *Eptatretus sp.*, membro da classe Agnatha .

Os achados revelaram que tal região é extremamente conservada. Apenas uma alteração molecular foi detectada dentre a população doadora de sangue, e nenhuma dentre os pacientes com CaP. A análise da região promotora dos vertebrados revelou o alto grau de similaridade da região, onde se encontram o sítio de ligação para a proteína Sp1 e os sítios de início de transcrição (Transcription Initiation Site) – TIS - I e II, bem como a ausência de seqüências do tipo TATA.

Abstract

ABSTRACT

The androgen receptor (AR) mediates the physiologic response to testosterone and dihydrotestosterone and plays a fundamental role at on male sexual development and on the maintenance of male secondary sex characters.

The *hAR* gene has a 5' UTR long region, suggesting that the sequence downstream to the transcription initiation sites (TIS) is necessary to gene expression. One important characteristic of the *hAR* gene is the absence of the TATA and CCAAT boxes so far considered as minimum promoter elements necessary to transcription.

The analysis of promoter sequences in eukariots shows the existence of polymorphisms that could be associated with low or high gene expression levels. This phenomenon leads to the question onceheather this variation introduces functional alterations that could change physiology, development and morphology of eukariots during the evolutionary process.

The purposes of present work were the investigation of: (i) polymorphisms within the *hAR*-5' UTR region in healthy blood donors individuals and prostate cancer patients, by SSCP and CSGE screening and sequencing, and (ii) the sequence analysis of the androgen receptor promoter region in 5 vertebrates species, including one primitive, *Eptatretus sp.*, member of the Agnatha class.

These results reveal that the region is extremely conservative, with high selective pressure. Only one mutation was detected among blood donor individuals and none among the prostate cancer patients. The promoter analysis in vertebrates revealed a high similarity degree at the promoter region that contains the TIS I and II sites and the Sp1 binding site, and the absence of the TATA and CCAT boxes.

Introdução

INTRODUÇÃO

A) ASPECTOS EVOLUTIVOS

Dentre os mais intrigantes problemas na evolução das espécies, encontra-se a investigação de eventos que foram importantes na origem dos vertebrados, especialmente aqueles relacionados com diferenças anatômicas e no desenvolvimento, quando comparados à de seus ancestrais invertebrados. Parte da resposta a esta questão encontra-se na duplicação de genes que codificam proteínas que controlam o complexo processo de desenvolvimento embriológico e pós-natal dos vertebrados.

A duplicação gênica é um mecanismo poderoso na evolução biológica, uma vez que, tendo-se duas cópias de um mesmo gene, estes podem incorporar mutações sem prejuízo no desempenho de sua função original, pois existirão as duas cópias produzindo a proteína. Desta forma, tais mutações poderão, adicionalmente, levar uma das cópias duplicadas a novas funções, gerando novos genes e promovendo vantagem seletiva (OHNO, 1970 *apud* BAKER, 1997).

A duplicação do genoma durante a transição de invertebrados para vertebrados, promovendo o aumento do repertório de genes nestes organismos, possivelmente contribuiu com tal complexidade (VENKATESH *et al.*, 2000). Acredita-se também que alguns destes genes recém-duplicados e fundamentais para a conquista de novos habitats pelos vertebrados tenham se mantido bastante conservados ao longo de milhares de anos.

O processo de crescimento e diferenciação celular requer uma ação conjunta de muitos fatores envolvidos na regulação da transcrição gênica. Entre estes fatores estão os membros da superfamília de receptores esteroideogênicos. Membros desta superfamília tem função de fatores de transcrição por sua ligação a seqüências nucleotídicas regulatórias localizadas nos genes-alvo. Os genes que compõem esta superfamília antiga evoluíram de um mesmo gene ancestral, antes da divergência da taxa dos vertebrados (LAUDETT *et al.*, 1992). Os hormônios esteroideogênicos, membros da superfamília de receptores nucleares, apresentam um papel central na reprodução de todos os vertebrados, com atuação direta na gametogênese, na organização cerebral, e no desenvolvimento e comportamento sexuais (YOUNG *et al.*, 1995).

Os receptores esteroideogênicos regulam a transcrição gênica pela interação com sítios específicos de DNA. Por apresentarem diversas estruturas de ligação, os receptores nucleares são um ótimo exemplo de como o processo de duplicação gênica e posterior divergência pode gerar uma família protéica que responde a diversos sinais para regular uma vasta variedade de processos fisiológicos (PINSKY *et al.*, 1996). A esta superfamília pertencem inúmeros genes essenciais à manutenção da vida, os quais são extremamente conservados ou tem alguma região gênica de alta conservação de seqüência nucleotídica.

A estrutura protéica de todos os membros da super família de receptores nucleares é muito semelhante, compreendendo pelo menos quatro domínios. Na região N-terminal encontram-se os domínios A e B, e é onde ocorre o controle de transativação de genes-alvo; o domínio C está situado na região de ligação ao DNA, a qual é a mais conservada e contém dois motivos de dedos de zinco; o domínio D corresponde à região de dobradiça; e finalmente, o domínio E na região C-terminal, de estrutura complexa e responsável pela ligação ao hormônio, dimerização e regulação da transcrição (LAUDETT *et al.*, 1992).

Os receptores nucleares, organizados modularmente, com vários graus de conservação entre seus respectivos domínios e cujos domínios são codificados por diferentes éxons, motivaram investigações sobre sua origem: se por sucessivas duplicações a partir de um ancestral comum ou se por consequência de duplicações independentes dos domínios de ligação ao DNA e de domínios de ligação de diferentes origens, formando uma estrutura quimérica (LAUDETT *et al.*, 1992).

Na tentativa de elucidar tal fato, ESCRIVA *et al* (1997) construíram uma filogenia baseada em várias seqüências conservadas dos receptores nucleares, utilizando, para tal, organismos-chave no processo evolutivo. Os dados obtidos com este trabalho corroboram a hipótese de que a habilidade de ligação-dependente foi adquirida independentemente pelos genes da super família ao longo da evolução, colocando os receptores órfãos como ancestrais. Deste modo, duplicações sucessivas impulsionaram a habilidade específica de ligação de cada receptor, confirmando a importância da duplicação gênica como mecanismo imprescindível na evolução biológica.

A análise do padrão de duplicação gênica dos membros da superfamília de receptores nucleares durante a evolução dos metazoários mostra que a atual diversidade dos receptores nucleares surgiu em decorrência de duas ondas de duplicação, uma antes da divergência dos cnidários (provavelmente envolvendo receptores órfãos), e uma segunda onda após a divergência dos vertebrados.

Nos primeiros vertebrados são encontrados inúmeros genes parálogos da superfamília de receptores nucleares. Isto significa que os ortólogos de cada gene em vertebrados atuais são encontrados nos primeiros vertebrados, já que os grupos parálogos evoluíram antes do último ancestral comum dos vertebrados (figura 1). Assim, os membros da subfamília de receptores esteroidogênicos, presentes apenas em vertebrados, devem ser vistos como cópias parálogas

vertebrado-específicas de um único receptor esteroideogênico ancestral (ESCRIVA *et al.*, 1997).

Um característica da filogenia desta superfamília é a pequena distância entre os receptores de andrógenos, progesterona, glicocorticóides e mineralocorticóides (figura 2), o que pode ser um indicativo de que estes quatro receptores estão envolvidos em duas duplicações gênicas próximas. Tais receptores têm sido encontrados apenas em vertebrados, e, analisando-se a árvore filogenética, pode-se prever que os receptores esteroideogênicos sexuais, e os adrenais, apareceram depois da separação da *Drosophila* (BAKER, 1997).

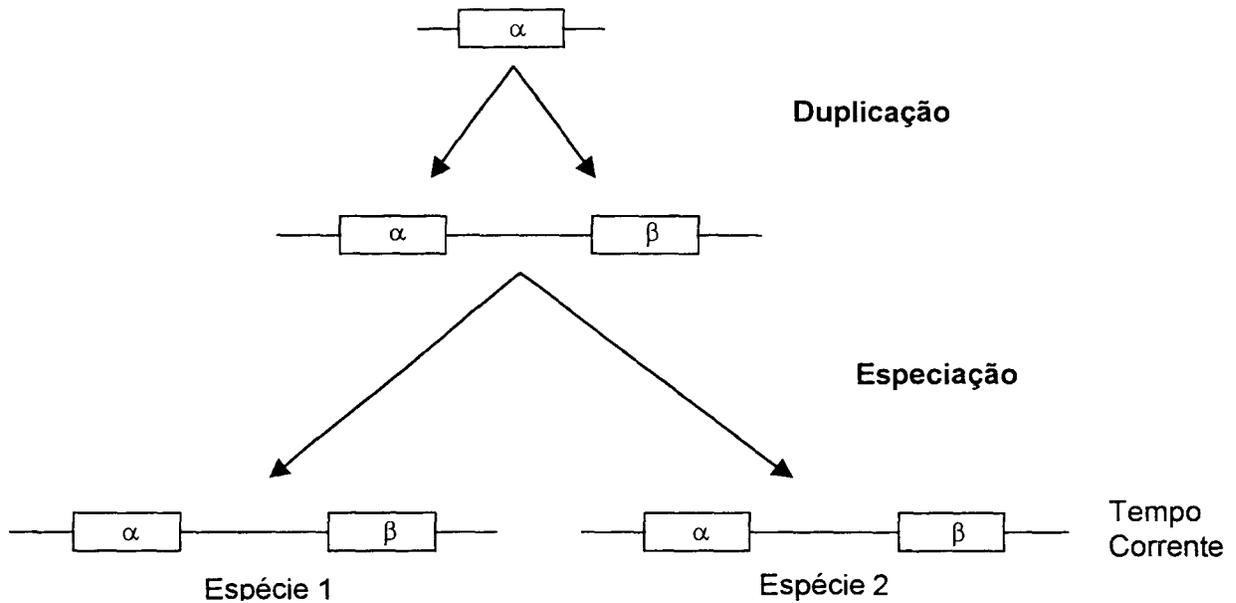


Figura 1: Genes parálogos e ortólogos. Dois genes, α e β , os quais derivaram, a partir de um gene precursor α , devido a um evento de duplicação gênica em uma espécie ancestral. Tal espécie, por sua vez, deu origem a duas outras espécies, 1 e 2, por mecanismo de especiação. Desta forma, pode-se dizer que os genes α nas espécies 1 e 2 são ortólogos, assim como os genes β . Porém, os genes α são cópias parálogas dos genes β .

As respostas fisiológicas, mediadas por tais receptores, promoveram aos “novos” vertebrados uma vantagem seletiva na competição com diversos organismos que surgiram durante a explosão do Cambriano e necessitavam de alguns ou todos os seus receptores esteroideogênicos. Deste modo, as respostas aos distúrbios do ambiente que são mediadas pela adrenal e pelos esteróides sexuais podem ter sido importantes na sobrevivência dos vertebrados durante as posteriores catástrofes ocorridas na Terra (Baker, 1997).

As respostas fisiológicas, mediadas por tais receptores, promoveram aos “novos” vertebrados uma vantagem seletiva na competição com diversos organismos que surgiram durante a explosão do Cambriano e necessitavam de alguns ou todos os seus receptores esteroidogênicos. Deste modo, as respostas aos distúrbios do ambiente que são mediadas pela adrenal e pelos esteróides sexuais podem ter sido importantes na sobrevivência dos vertebrados durante as posteriores catástrofes ocorridas na Terra.

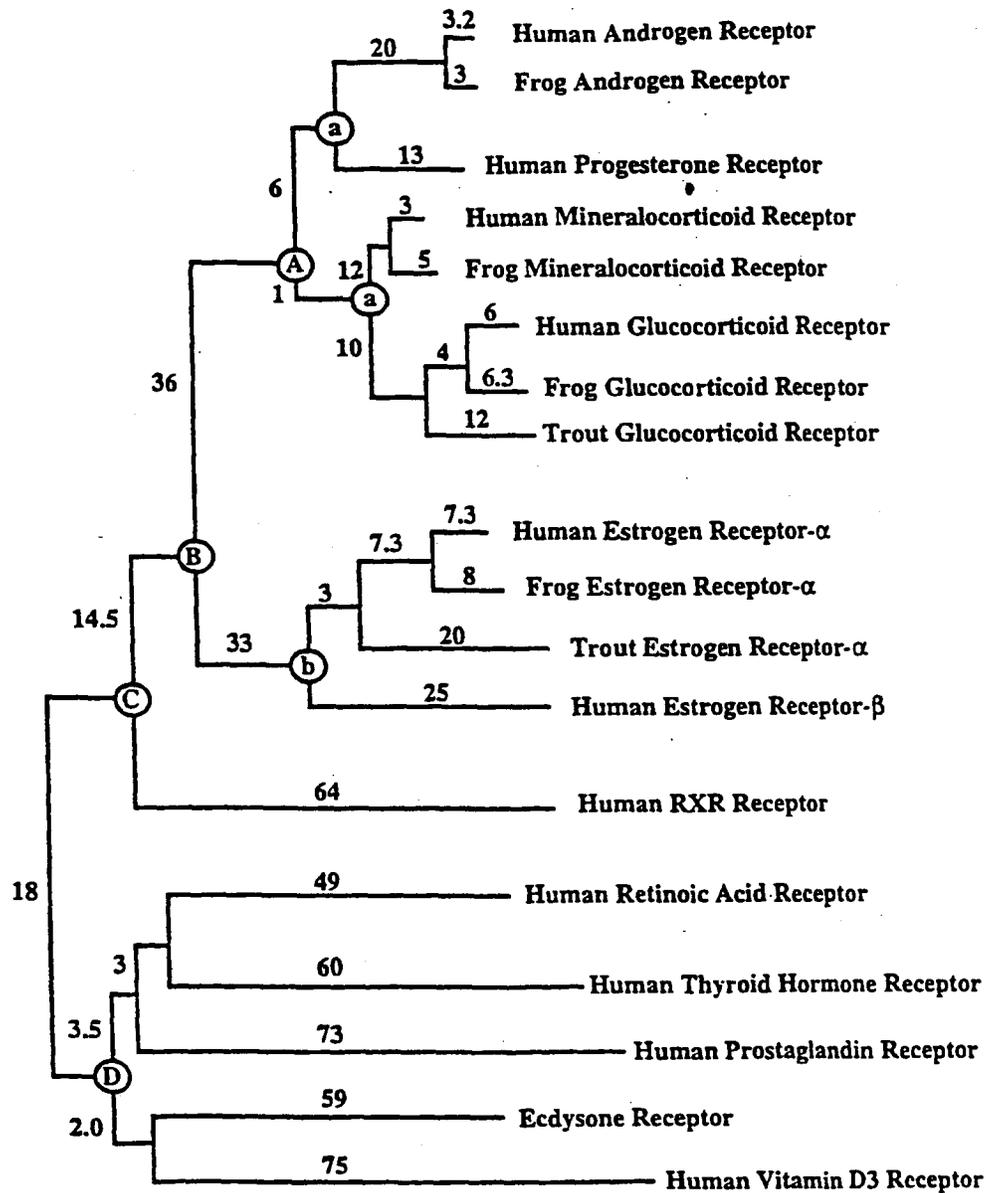


Figura 2: Filogenia dos receptores nucleares (reproduzido de Baker, 1997).

Assim como outros receptores esteroideogênicos, os andrógenos podem se ligar ao seu receptor e modular a expressão gênica, ao interagir diretamente com os elementos responsivos aos andrógenos (AREs) (MIZOKAMI *et al.*, 1994). Desta forma, como um fator de transcrição com ampla distribuição, o gene do receptor de andrógenos possui uma grande influência sobre diversas funções biológicas (QUIGLEY *et al.*, 1995).

O gene do receptor de andrógenos (RA), juntamente com os outros genes que determinam a função sexual e a aptidão reprodutiva, ocupa um papel vital na manutenção das espécies. O gene do receptor de andrógenos é localizado em uma posição altamente conservada no cromossomo X por, pelo menos, 150 milhões de anos (QUIGLEY *et al.*, 1995). O receptor de andrógenos é o responsável por mediar a resposta fisiológica à testosterona e à dihidrotestosterona, tendo um papel fundamental no processo de desenvolvimento sexual e manutenção dos caracteres sexuais masculinos (FABER *et al.*, 1991). A regulação da proteína receptora androgênica constitui um importante nível de controle no qual os efeitos fisiológicos da testosterona, responsável pelo dimorfismo sexual em tecidos não-reprodutivos, podem ser modulados (BAARENDS *et al.*, 1990).

THORNTON & KELLEY (1998) analisaram a seqüência completa do gene RA bem como os quatro domínios funcionais em separado em várias espécies de vertebrados. As taxas de substituição de nucleotídeo por milhão de anos confirmaram o que se deduzia, em função dos estudos realizados em indivíduos com Síndromes de Insensibilidade aos Andrógenos (SIAs), que procuravam relacionar a mutação encontrada com o fenótipo. As SIAs compreendem um espectro de desordens com variações fenotípicas que abrangem desde indivíduos do sexo masculino com genitália externa feminina e vagina em fundo cego, passando por vários graus de ambigüidade genital, até homens com infertilidade. Em geral mutações na região amino-terminal estão associadas aos quadros mais leves, enquanto que mutações nas regiões conservadas (como por exemplo, a de

ligação ao DNA) promovem distúrbios mais graves (como o fenótipo feminino em indivíduos com sexo genético masculino). Alterações moleculares nas regiões de dobradiça e de ligação ao hormônio estão geralmente, mas não exclusivamente, associadas às ambigüidades genitais (QUIGLEY *et al.*, 1995).

Assim, a região amino-terminal, a mais longa e cuja função é a menos crucial no processo de ligação e ativação do complexo hormônio-receptor é justamente a que possui a maior taxa de substituições (1,25); a região de dobradiça (localizada entre a região de ligação ao DNA e a de ligação ao hormônio) possui uma taxa de 0,86; a região de ligação ao hormônio uma taxa de 0,19, bem menor em relação às duas primeiras como esperado e finalmente a região de ligação ao DNA com uma taxa extremamente baixa, de 0,04, confirmando a importância de seu papel no processo da atuação dos andrógenos em indivíduos do sexo masculino. A taxa de substituições da seqüência completa do gene é de 0,69 por milhão de anos (THORTON & KELLY, 1998).

Deste modo, uma análise comparativa de seqüências do gene do receptor de andrógenos de várias espécies pôde mostrar a variabilidade e a conservação de domínios e sítios específicos bem como promover uma base para inferências evolutivas e funcionais. Uma vez que se possa elucidar inter-relações, tanto em termos de estrutura-função protéicas como em termos de análise nucleotídica, da proteína receptora androgênica, muito poderá nos ser revelado sobre as proteínas de lentas mudanças, auxiliando na compreensão do seu papel evolutivo, extremamente importante para os vertebrados, e das bases estruturais que levam a doenças em humanos, como a Síndromes de Kennedy e de Insensibilidade aos Andrógenos (CHOONG *et al.*, 1998).

B) REGIÃO PROMOTORA

Os genes que codificam proteínas em vertebrados tipicamente consistem de regiões transcritas e outras não. As regiões não transcritas são designadas de acordo com a sua posição em relação à porção transcrita como seqüências flanqueadoras 5' ou 3'. A porção flanqueadora 5' contém seqüências específicas que atuam como sinais determinando o processo de iniciação, a duração, e a especificidade tecidual do processo transcricional, e é conhecida como região promotora dos genes.

Em geral, a região promotora consiste das seguintes seqüências sinalizadoras: TATA box, responsável pela escolha do ponto de início de transcrição, CAAT box, e GC box. Estes dois últimos são responsáveis pela ligação inicial da RNA polimerase II ao DNA. Porém, nenhum desses sinais são unicamente essenciais para o funcionamento da região promotora. Alguns genes, como os constitutivos (ou "housekeeping"), não possuem TATA ou CAAT "boxes", e o processo transcricional é controlado por outros elementos da seqüência flanqueadora 5'.

Para uma melhor compreensão dos fatores que controlam a expressão do gene do receptor de andrógenos durante a embriogênese e na fase adulta, e da sua regulação transcricional, sua região promotora foi isolada e caracterizada *in vitro* (TILLEY *et al.*, 1990). Em humanos, o gene do receptor de andrógenos tem uma região 5' não transcrita longa, com cerca de 3400 pb, o que sugere que a seqüência compreendida entre os sítios de início de transcrição e o códon referente ao início da tradução é necessária à sua expressão (MIZOKAMI *et al.*, 1994; PINSKY *et al.*, 1996).

Uma importante característica deste gene é a ausência das seqüências TATA e CCAAT, elementos promotores mínimos necessários à transcrição em eucariotos, sendo que este gene apresenta a mesma habilidade de iniciar o processo de transcrição, em geral por intermédio de uma proteína capaz de interagir com seqüências iniciadoras ricas em pirimidinas (FABER *et al.*, 1993; WOLFF *et al.*, 1993).

Os sítios de início da transcrição (TIS -“Transcription Initiation Site”) se encontram localizados à montante do sítio de início da tradução do receptor de andrógenos, nas posições +1 (AR-TIS II) e +12 (AR-TIS I) e acredita-se que estes sejam regulados por seqüências promotoras diferentes (TILLEY *et al.*, 1990; MIZOKAMI *et al.*, 1994). Apesar da ausência dos “box” de seqüências promotoras acima mencionados, o gene do receptor de andrógenos contém o “box” GC, sítio de ligação para o fator de transcrição de mamíferos Sp1, na posição -45 a -40 do início do sítio transcrição TIS II, o qual se encontra presente em muitos genes “housekeeping” (MIZOKAMI *et al.*, 1994). O elemento responsivo CRE-cAMP (posição -501) e o sítio Ap1 (posição -1226) são também encontrados na região promotora do gene RA, tendo importância no processo transcricional (FABER *et al.*, 1993).

Os estudos de caracterização de região promotora de vários genes vieram a mostrar que estas regiões também são polimórficas, assim como estudos funcionais *in vitro* tem procurado avaliar o envolvimento de tais polimorfismos em nível de expressão gênica. Entretanto, ainda são relativamente poucos os exemplos de polimorfismos de região promotora em humanos que foram adequadamente caracterizados por estudos funcionais (TAUTZ, 2000). Porém, uma vez que todas as regiões gênicas podem conter polimorfismos, estes devem ser freqüentes *per se*, sendo tais variantes consistentes e explicáveis segundo o modelo Neutralista. Entretanto, é possível que os polimorfismos da região promotora que afetam especificamente a expressão gênica confirmem, ou possam conferir uma vantagem seletiva (COOPER, 1999).

Como parte da identificação de mutações de linhagens germinativas e/ou polimorfismos no gene do receptor de andrógenos associados ao câncer de próstata, CROCITTO *et al.* (1997) analisaram a região 5' não traduzida (5' UTR) em DNAs genômicos de 38 pacientes com tais casos de câncer. Esses autores detectaram duas mutações em sítios que podem modular a expressão do gene RA, afetando os níveis de transcrição e/ou tradução. Desta forma, torna-se extremamente importante saber de que modo polimorfismos e/ou mutações podem afetar o nível da expressão gênica, já que uma grande exposição a uma expressão aumentada deste gene pode potencialmente predispor ao câncer de próstata (CUDE *et al.*, 1999).

Assim, substituições que ocorram em regiões codificantes certamente vão atuar na estrutura terciária ou quaternária de uma proteína, afetando fisicamente a função protéica, enquanto substituições em regiões promotoras afetarão os níveis transcricionais. Mudanças adaptativas na expressão de uma proteína têm uma maior probabilidade de ocorrer do que mudanças que afetem diretamente a estrutura protéica, já que mutações em regiões promotoras não são restritas a “códon-usage” ou ao efeito de trocas de aminoácidos na estrutura terciária ou quaternária de uma proteína (CRAWFORD *et al.*, 1999).

Ao analisar a função de uma proteína ou região de importância do DNA, pode-se notar que quanto mais específico for o papel da molécula, menores serão as mudanças evolutivas em bilhões de anos, dado que elas precisam desempenhar seu papel com grande precisão (NEI, 1983). Se considerarmos que a maioria das mudanças evolutivas em nível molecular é causada por erros randômicos da polimerase, fixando mutantes neutros (ou quase neutros) nas espécies, os polimorfismos de DNA, desta forma, seriam uma fase transiente da evolução molecular. Porém, não se pode esquecer que mesmo que as mutações sejam eventos estocásticos, há regiões preferenciais no genoma passíveis à introdução de tais erros, os “hot spots” (LI & GRAUR, 1991).

Por fim, pode-se dizer que o saldo deste aumento progressivo de caracterização da região promotora de inúmeros genes, revelando polimorfismos em tais regiões, foi tanto o questionamento do envolvimento destas regiões e seus polimorfismos com o nível de expressão gênica como uma análise evolutiva da sua função (CROCCITO *et al.*, 1997; OKSANEN *et al.*, 1998). Por esta razão, estudos referentes à presença de alterações moleculares na região promotora de vários genes vêm sendo realizados. Com isso, tornou-se lugar-comum a idéia de que seqüências regulatórias devam ser alvos primários para a introdução de alterações que podem atuar no processo evolutivo (TAUTZ, 2000).

c) ESTUDO DE UM VERTEBRADO BASAL DA CLASSE AGNATHA: *EPTATRETUS SP.*

Atualmente os peixes vêm sendo considerados bons modelos na pesquisa biológica. Dentre as características que conferem tal condição aos peixes estão o pequeno genoma de várias espécies quando comparados ao tamanho do genoma humano. Considerando-se a expectativa de que os genes humanos mais importantes estão presentes e conservados nos peixes, acredita-se que tais genomas compactos atuam como ferramentas versáteis e heurísticas para projetos genômicos de modo geral. No peixe *Fugu*, por exemplo, o gene correspondente ao da Coréia de Huntington em humanos é 7,4 vezes menor (WITTBRODT *et al.*, 1998).

Inesperadamente, o aumento do número de genes caracterizados em peixes nos bancos de dados sugere, de modo forte e surpreendente, que muitas famílias multigênicas contêm mais membros funcionais do que em mamíferos, como um aspecto resultante do acúmulo de informação genômica. Tal número aumentado de genes em peixes possivelmente foi causado por duplicações gênicas anteriores adicionais, as quais aconteceram nas espécies ancestrais que levaram às modernas, mas não aos ancestrais que levaram aos tetrápodes. Uma vez que estas duas linhagens dividem o seu último ancestral comum no Devoniano (a cerca de 460 milhões de anos), duplicações individuais de membros de famílias gênicas foram perdidas em peixes (WITTBRODT *et al.*, 1998).

As duplicações envolvendo a maior parte dos genomas ocorreram durante a transição dos cordados simples para os vertebrados (LAUDETT *et al.*, 1992). Justamente nesta interface é que se encontram os “hagfishes” (ou feiticeiras), os primeiros craniados (MARTINI, 1998).

Há muitos anos os hábitos dos “hagfishes” e o seu lugar na árvore evolutiva da vida tem sido objeto de muitas conjecturas. Estudos recentes indicam que tais peixes, os quais parecem ter mudado muito pouco em 330 milhões de anos, de muitas formas lembram os primeiros craniados primitivos. O caminho evolutivo que levou aos humanos e a outros vertebrados, provavelmente divergiu do caminho dos “hagfishes” a cerca de 530 milhões de anos atrás (MARTINI, 1998).

A forma do “hagfish” é muito simples, assim como suas funções. Eles não possuem olhos ou pares de nadadeiras, e seu esqueleto rudimentar consiste apenas de notocorda e vários elementos cartilagosos pequenos, incluindo um crânio também rudimentar. Estes peixes também não possuem mandíbulas, e suas guelras são espalhadas ao longo da porção mais proximal da abertura bucal, sendo diferentes das guelras de qualquer outro peixe existente (MARTINI, 1998).

São encontrados em águas marinhas de todo o mundo, com exceção, aparente, dos mares Ártico e Antártico. Apesar de serem seres abissais, podem sobreviver em uma gama de profundidades, sendo a temperatura o fator primário de determinação de seu habitat (no mínimo 22°C). Em muitos locais do mundo os “hagfishes” têm se tornado o foco de um grande e próspero comércio de pesca, pois desde a década de 60 a sua pele, devido a sua coloração exótica e a sua textura, tem sido utilizada na confecção de bolsas e sapatos, por exemplo.

Existem aproximadamente 60 espécies de “hagfishes”, a maioria delas pertencente a dois gêneros principais: *Eptatretus* e *Myxine*, sendo os pertencentes ao primeiro gênero, em geral, maiores. Estes animais são tidos como os “limpadores” do fundo dos mares, pois se alimentam de animais mortos e em decomposição.

Apenas alguns detalhes são conhecidos a respeito da reprodução destes animais. As suas gônadas se formam a partir de uma prega de tecido no lado direito do abdômen. Nas fêmeas um ovário se forma nos 2/3 anteriores à prega, e nos machos um testículo se forma no terço posterior. Estas fêmeas produzem cerca de 20 a 30 ovos em forma de elipse, porém não se sabe como se dá a fecundação. Em algumas espécies há cerca de 100 fêmeas para cada macho, sendo raro encontrar um indivíduo com ambos os sexos (GORBMAN, 1990).

Além disso, ao contrário do que parece ocorrer com os peixes “modernos”, o tamanho do genoma estimado para a classe Agnata é bastante próximo ao do genoma humano (LI, 1997).

Dado esta biologia bizarra e misteriosa dos “hagfishes”, não é de se estranhar que tais animais não foram imediatamente reconhecidos ou aceitos como ancestrais distantes dos humanos. Atualmente os “hagfishes” são considerados máquinas biológicas virtuais do tempo. O termo “fóssil vivo”, o qual é usualmente utilizado ao referir-se ao *Coelacanthus*, um peixe raro e abissal, faz com que este, se comparado ao “hagfish”, parecer um “recém nascido evolutivo” (MARTINI, 1998).

Objetivos

OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos específicos:

1) O estudo de polimorfismos da região promotora do gene do receptor de andrógenos em uma amostra de indivíduos doadores de sangue da população, bem como em pacientes portadores de câncer de próstata, para investigar a presença de alterações moleculares que causem possíveis efeitos em nível de expressão gênica;

2) A caracterização molecular do gene do receptor de andrógenos e de sua região promotora em *Eptatretus sp.*, um vertebrado basal, com o intuito de verificar o grau de similaridade entre a seqüência do gene RA deste em relação à copia humana do gene, avaliando sua conservação. Com isso, poder-se-ia compreender um pouco mais sobre a história evolutiva do gene, bem como o seu papel na manutenção das espécies;

3) A caracterização molecular da região promotora do gene do receptor de andrógenos em outros vertebrados para determinar o grau de similaridade entre tais seqüências e avaliar sua conservação.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em Humanos

a) Casuística

A amostra analisada constituiu-se de 100 indivíduos do sexo masculino, cujo DNA foi obtido a partir de sangue periférico coletado de doadores de sangue do Hemocentro UNICAMP. A idade desses doadores variou de 18 a 58 anos.

b) Coleta de sangue

Com o intuito de se ter um banco de amostras de DNA genômico humano em nosso laboratório, pedimos permissão ao Hemocentro da UNICAMP para coletarmos amostras de sangue de doadores de sangue do sexo masculino. A estes indivíduos foi dado um formulário a ser preenchido com dados pessoais, um termo de consentimento para utilização do DNA a ser obtido a partir do sangue coletado, bem como explicações sobre o estudo a ser desenvolvido.

c) Extração de DNA

A partir destas amostras de sangue total, coletadas no Hemocentro da UNICAMP foi extraído o DNA, segundo protocolo estabelecido no Laboratório de Genética Humana do CBMEG (ARAÚJO *et al.*, 1996).

d) Amplificação da Região Promotora pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

De forma a abranger o máximo possível a região promotora do gene do receptor de andrógenos humano, foram desenhados quatro pares de iniciadores, cujos produtos de amplificação cobriram 1235 pares de bases da região promotora do gene RA. Com o intuito de se evitar contaminação, foram utilizadas ponteiras com filtro para a manipulação das amostras de DNA. Em todas as séries de amplificações realizadas incluiu-se um tubo sem DNA como controle negativo. Na tabela 1 encontram-se descritas as seqüências de cada iniciador usado, bem como o tamanho de cada produto obtido e a temperatura de anelamento. A localização de cada iniciador na região promotora está mostrada na figura 3. Já na tabela 2 encontram-se indicadas as condições de amplificação para cada par de iniciadores.

Tabela 1: Seqüência dos iniciadores para a amplificação da região promotora do gene do receptor de andrógenos em humanos.

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Fragmento Gerado	Temperatura de hibridização
10 S	GTGAGTGCTGGCCTCCAGGA	424	64°C
2	GAGGTCACGACATGTCCTCGGC		
3C	GTTGCATTTGCTCTCCACCTCCC	261	60°C
4C	TCACCGAAGAGGAAAGGGCAGCTC		
1C	CTTCGAAGCCGCCGCCCGG	351	62°C
2C	TGGCTCCTAAGAGCCTTCTT		
776 S	TGCAGAGAGGTAACTCCCTTTG	489	64°C
1245 AS	CGCTCTGAGAGCCTCAAAGTC		

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 50 µl, com a seguinte concentração de reagentes: 100 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 30 pMol de cada iniciador; 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase; 1,5 mM de MgCl₂, presentes no tampão 10X específico da enzima (Gibco BRL).

-303

CCAAATTTCTGTGAGTGCTGGCCTCCAGGAAATCTGGAGCCCTGGCGCCTAAACCTT
 GGTTT TAGGAAAGCAGGAGCTATTCAGGAAGCAGGGGTCTCCAGGGCTAGAGCTAG
 CCTCTCCTGCCCTCGCCACGCTGCGCCAGCACTTGTTTCTCCAAAGCCACTAGGC
 AGGCGTTAGCGCGCGGTGAGGGGAGGGGAGAAAAGGAAAGGGGAGGGGAGGGAAAA
 GGAGGTGGGAAGGCAAGGAGGCCGCCGGTGGGGCGGGACCCGACTCGCAAACCT
 GTTGCATTTGCTCTCCACCTCCCAGCGCCCCCTCCGAGATCCCGGGGAGCCAGCTT
 GCTGGGAGAGCGGGACGGTCCGGAGCAAGCCACAGGCAGAGGAGGGGACAGAGGG
 AAAAAGGGCCGAGCTAGCCGCTCCAGTGCTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCAC
 GCCAGCCCCAGCCGGCTCCAGCGACAGCCAACGCCTCTTGCAGCGCGGCGGCTTC
 GAAGCCGCCGCCGAGCTGCCCTTTCCCTCTTCGGTGAAATTTTTAAAAGCTGCTA
 AAGACTCGGAGGAAGCAAGGAAAGTGCCTGGTAGGACTGACGGCTGCCTTTGTCTC
 CCTCCTCTCCACCCCGCTCCCCCACCTGCCTTCCCCCCTCCCCGCTTCTC
 TCCCGCAGCTGCCTCAGTCGGTACTCTCAGCCAACCCCTCACCACCTTCTCC
 CCACCCGCCCCCGCCCCGTCGGCCAGCGCTGCCAGCCGAGTTTGCAGAGAG
 GTA ACTCCCTTTGGCTGCGAGCGGGCGAGCTAGCTGCACATTGCAAAGAAGGCTCT
 TAGGAGCCAGGCGACTGGGGAGCGGCTTCAGCACTGCAGCCACGACCCGCTGGTT
 AGGCTGCACGCGGAGAGAACCCTCTGTTTTCCCCACTCTCTCTCCACCTCCTCCT
 GCCTTCCCCACCCCGAGTGC GGAGCCAGAGATCAAAGATGAAAAGGCAGTCAGGT
 CTT CAGTAGCCAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAGCCGAAATAAAAAGAAAA
 AGATAATAACTCAGTTCTTATTTGCACCTACTTCAGTGGACACTGAATTTGGAAGG
 TGGAGGATTTTGT TTTTTCTTTTAAAGATCTGGGCATCTTTTGAATCTACCCTTCA
 AGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGATCTTGTCACCCTGTGTCT
 TCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGCGCTTTTTGCGTGGTTGCTCCCGCA
 AGTTTCTTCTCTGGAGCTTCCCGCAGGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCA
 TCATCACAGCCTGTTGAACTCTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAA
 GTAGGTGGAAGATTCAGCCAAGCTCAAGGATG +1127

Figura 3: Localização, na região promotora, dos iniciadores utilizados para amplificação, do sítio de ligação para Sp1 (em azul claro) e os TIS I e II (em verde claro), e o códon referente ao início de tradução ATG (em lilás). Numeração segundo TILLEY *et al.*, 1990.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.2%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, contendo brometo de etídio para posterior visualização sob iluminação ultravioleta, a fim de se verificar a eficiência da reação.

Tabela 2: Condições de amplificação.

Reagentes (μ l)	Iniciador 10S/2	Iniciador 1C/2C	Iniciador 3C/4C	Iniciador 776/1245
H ₂ O	33,25	33,75	34,25	32,75
Tampão 10X	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	1,5	1,5	1,5	2,0
dNTPs (10mM)	5,0	5,0	5,0	5,0
Primer Sense	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)
Primer Antisense	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)	1,5 (30 pMol)
DNA	2,0	1,5	1,0	2,0
Enzima (Taq)	0.25 (~1U)	0.25 (~1U)	0.25 (~1U)	0.25 (~1U)
Temperatura (°C)	64	63	62	62

e) Detecção de Polimorfismos

1) SSCP

Para o rastreamento de alterações moleculares utilizou-se como um primeiro ensaio a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples de DNA por SSCP - "Single Strand Conformation Polymorphism" (ORITA *et al.*, 1989), por ser rápida e amplamente utilizada no nosso laboratório, além da disponibilidade do equipamento Phastsystem (PHARMACIA LKB) no mesmo.

Esta técnica baseia-se na observação de que as fitas simples de DNA, obtidas pela desnaturação do DNA dupla-hélice, formam estruturas ou configurações secundárias variáveis, em função da seqüência de nucleotídeos. Essas fitas podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes, onde sua conformação é estabilizada por interações intrafita. A migração das fitas simples e, conseqüentemente, o padrão das bandas observadas no gel, dependem da constituição das bases, a qual se reflete na configuração de cada um dos tipos de fitas simples presentes na amostra, em função da temperatura a que elas estão expostas na eletroforese.

Alíquotas de 3 μ l dos produtos da reação PCR foram misturadas a 6 μ l de "stop solution", a qual contém formamida 95%, 20 mM de EDTA pH 8.0, e 0,05% de azul de bromofenol. Estas misturas foram desnaturadas a 95°C por 7 min e mantidas em gelo até o momento da aplicação. A análise da PCR-SSCP foi realizada utilizando-se tanto os géis pré-moldados de 12,5% como os de 20% para Phastsystem, e subseqüentemente corados pela prata.

Inicialmente as corridas foram realizadas em géis pré-moldados de 20% de concentração, a uma voltagem de 150V a 15°C por 250 Vhs. Como nenhuma alteração no padrão de migração das bandas foi encontrado nas corridas sob esta condição, repetiu-se a análise em gel de 12,5%. O tampão de corrida utilizado foi o SDS (Tricina 0.20 M; Tris 0.20 M; SDS 0.55%; pH 8.1), o que dispensa necessidade de pré-corrída. Os géis foram corados pela prata, no próprio equipamento Phastsystem, seguindo as etapas de revelação e fixação discriminadas abaixo:

- 1) Solução de ácido tricloro-acético a 20%, por 5 min a 20°C;
- 2) Solução de glutaraldeído a 5%, por 5 min a 50°C;
- 3) Água MilliQ, por 2 min a 50°C (2X);
- 4) Solução de nitrato de prata a 0.4%, por 5 min a 50°C (2X);
- 5) Solução de carbonato de sódio a 2.5% contendo formaldeído (37.5 µl/100ml), por 30 segundos a 30°C, seguida por nova incubação por 4 min a 30°C;
- 6) Solução de ácido acético a 5%, por 2 min a 30°C;
- 7) Solução de glicerol a 13%, por 3 min a 50°C.

b) CSGE

A técnica de CSGE baseia-se na migração diferencial de heteroduplexes formados pelos produtos de PCR, com uma sensibilidade de 90%, para fragmentos de 300 a 800 pb (GANGULY *et al.*, 1993). O produto da PCR é desnaturado a 98°C por 15 minutos, seguido por uma incubação a 68°C por 1 hora. Neste período ocorrem re-associações aleatórias das fitas de DNA de ambos os alelos. Se houver alteração na seqüência nucleotídica, a re-associação das fitas não será perfeita, formando-se outras estruturas secundárias, diferentes do padrão esperado, as quais migrarão de forma diferenciada no gel de poliacrilamida moderadamente

desnaturante.

Como todos os doadores são do sexo masculino, possuindo assim apenas um cromossomo X, visto que o gene RA está presente neste cromossomo, fez-se necessário misturar a cada PCR de cada indivíduo a mesma quantidade de um PCR controle, previamente seqüenciado. Desta forma, se houvesse alguma alteração em qualquer um dos indivíduos, o heteroduplex seria formado.

Para o preparo da solução estoque (40%) utilizou-se 39,6% de acrilamida e 0,4% de um análogo da bisacrilamida, a bis-acrilóil-piperazina (BAP), diluídos em 100ml de água destilada, e filtrados. Para o preparo do gel de CSGE foram adicionados 37,5 ml da solução estoque, 15ml de etilenoglicol, 22,5ml de formamida desionizada, 3,75 ml de tampão Tris-Taurina-EDTA (TTE) 20X, 71,25 ml de água destilada, 1,5 ml de persulfato de amônio 10% e 60 µl de TEMED. Este gel foi colocado para polimerizar entre placas de seqüenciamento, utilizando-se um espaçador de 1 mm de espessura e um pente para 32 amostras. Na porção superior da cuba o tampão de corrida (TTE) é diluído 1:80, enquanto que na porção inferior a diluição é de 1:20.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 5µl do produto de PCR de um controle previamente seqüenciado foram misturadas a 5µl de cada amostra, e incubadas a 98°C por 5 minutos seguidos por uma incubação a 68°C por 90 minutos. Após 60 minutos a 68°C as amostras foram retiradas, adicionando-se a cada uma 5 µl do tampão de carregamento (20% v/v de etilenoglicol; 30% v/v de formamida; 0,4 g de xilenocianol e 0,4 g de azul de bromofenol), sendo então aplicadas ao gel. Após as 16 horas de corrida a 300 V, o gel foi corado com brometo de etídio a uma concentração final de 0,1mg/ml. O gel foi mantido nesta solução por 15 minutos, permanecendo aderido a uma das placas nas quais foi corrido. Após o tempo de coloração envolveu-se filme plástico do tipo Vitafilm por toda a extensão do gel para que o mesmo fosse retirado da placa de vidro e transportado ao transiluminador para visualização em luz ultra-violeta e

documentação em filme Polaroid.

f) Seqüenciamento manual

A amostra que apresentou migração diferencial por CSGE foi seqüenciada manualmente pelo método de SANGER (1977). A cada 2,5 µl de produto de amplificação pela PCR foram adicionados 2,5 µl de água Milli Q estéril, perfazendo o volume de 5 µl, volume este necessário para a reação de pré-tratamento, a qual consiste na ação de 1 µl da enzima Exonuclease I e de 1µl da enzima fosfatase alcalina por 15 minutos a 37°C, sendo inativadas a seguir por aumento de temperatura (15 minutos a 80°C). Esta reação foi brevemente centrifugada para que se tivesse novamente todo o volume inicial da reação.

Ao volume total de reação (7µl) foram adicionados: 8 µl de água estéril; 2 µl de tampão de reação; 1 µl do iniciador específico (3C ou 4C), na concentração de 2 pM; e, por fim, 2 µl da enzima Thermosequenase™ (Amersham), obtendo-se desta forma um volume final de 20 µl. Destes 20 µl, colocou-se 4,5 µl em cada tubo (G,A,T,C) contendo 0,5 µl do seu ddNTP correspondente misturado a 2 µl do dGTP Master Mix.

Estes tubos, agora contendo o produto da PCR, o iniciador, o tampão de reação, a enzima, o dGTP MasterMix e o seu ddNTP [α -³³P] específico (G, A, T ou C) foram levados a um termociclador a fim de processar a reação. No caso do iniciador universal a temperatura de hibridização é de 50°C. Deste modo, a reação se dá em 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos.

2) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em Pacientes com Câncer de Próstata (CaP)

a) Casuística

As amostras de DNA dos 100 pacientes com CaP foram obtidas por intermédio da colaboração estabelecida com os Drs. José Carlos Mesquita e Andréa Borduchi Carvalho-Salles do Hospital de Base e do Hemocentro de São José do Rio Preto, respectivamente. Tais indivíduos portadores de CaP, com idades variando entre 43 e 96 anos, foram avaliados no serviço de Urologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, onde se estabeleceu o diagnóstico de adenocarcinoma de próstata.

b) Amplificação da Região Promotora do gene RA em pacientes com CaP

As condições de amplificação usadas para o promotor do gene RA em pacientes com CaP foram exatamente as mesmas usadas para amplificação desta região nos 100 indivíduos doadores de sangue. Novamente, foram utilizadas ponteiras com filtro para a manipulação das amostras de DNA, com o intuito de se evitar contaminação. Em todas as séries de amplificações realizadas incluiu-se um tubo sem DNA como controle negativo. Porém, como a região de interesse nesse caso era a que contém o sítio de ligação para a proteína Sp1 e os sítios de início de transcrição TIS (Transcription Initiation Site) I e II, apenas a porção distal (correspondente aos pares de iniciadores 10S/2C e 3C/4C) foi amplificada pela PCR e analisada por SSCP e CSGE. Essa região foi especificamente selecionada para estudo em pacientes com CaP em virtude dos achados de CROCCITO *et al*, (1997).

3) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em Vertebrados

a) Amostras

As amostras de DNA de mamíferos e da ave utilizadas para a amplificação por intermédio da PCR foram gentilmente cedidas pela Profa Dra Edi Lúcia Sartorato do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP, e o protocolo de extração de DNA, a partir de sangue periférico, dessas amostras encontra-se descrito em SARTORATO, 1994. Para a extração de DNA genômico a partir de fígado do peixe (*Eptatretus sp.*) padronizou-se um outro protocolo, descrito no tópico a seguir.

Os animais usados na análise foram:

Gato – *Felix sp.*

Boi - *Bos taurus*

Cavalo – *Equuos caballus*

Macaco prego – *Cebus nigrivitattus*

Galinha – *Gallus gallus*

Peixe – *Eptatretus sp.*

b) Amplificação da região promotora

No caso da região promotora do gene RA de vertebrados optou-se, assim como nos pacientes com CaP, por amplificar apenas a região mais conservada, ou seja, a que corresponde aos pares de iniciadores 10S/2, e 3C/4C. As condições de amplificação utilizadas foram as mesmas que em doadores e pacientes com CaP. Todas as reações foram montadas utilizando-se ponteiras com filtro.

Uma vez que foram usados iniciadores não-específicos para cada seqüência de vertebrados, optou-se pela clonagem dos produtos de amplificação gerados pela PCR, com o intuito de se usar os iniciadores do sítio de clonagem do vetor para seqüenciar os insertos de interesse.

A concentração dos produtos de amplificação foi estimada por comparação com um marcador de peso molecular em gel de agarose. Deste modo, adicionou-se a um tubo eppendorff 1 μ l de inserto (125ng/ μ l), 1 μ l de vetor pGEM (50ng/ μ l), 1 μ l de T4 DNA ligase (3U/ μ l), 5 μ l de tampão 2 X (Tris-HCl 60mM pH 7,8; MgCl₂ 20mM; DTT 20mM; ATP 2mM; polietilenoglicol 10%), e o volume final foi ajustado para 10 μ l com água MilliQ. Esta mistura foi incubada "overnight" em geladeira (8°C).

Para a transformação adicionou-se 5 μ l da reação de ligação a 100 μ l de células competentes DH5 α , permanecendo por 30 minutos em banho de gelo. Após este período foi dado um choque térmico à 42°C por 50 segundos, adicionando-se, logo a seguir, 900 μ l de meio LB. O material foi transferido para um banho-maria a 37°C por 1 hora.

Durante este tempo de espera, em placas de meio LB-ágar com ampicilina (50µg/ml) foram distribuídos homogeneamente 35 µl de X-gal (50mg/ml). Este procedimento é realizado em fluxo laminar, onde as placas permanecem por alguns minutos, até a sua completa secagem.

Tendo expirado o tempo de permanência das células transformadas sob a agitação, uma alíquota de 200 µl foi distribuída homogeneamente nas placas pré-tratadas com X-gal, sendo assim incubadas em estufa à 37°C “overnight”.

As colônias brancas (recombinantes), foram inoculadas em 3 ml de meio LB com 6 µl de ampicilina (50ug/ml), e colocadas em “shaker” a 37°C “overnight” com uma agitação de 150 rpm, condições estas para facilitar o seu crescimento. Após o crescimento do inóculo, procedeu-se à extração dos plasmídeos pela técnica de mini-preparação descrita abaixo.

Para o isolamento dos plasmídeos (ZHOU *et al.*, 1990), transferiu-se cerca de 1,25 ml de cultura para um tubo eppendorff novo, centrifugando-a por 10 segundos. Forma-se um “pellet” de bactérias no fundo do tubo. Assim, descarta-se quase o volume total de sobrenadante, deixando-se apenas cerca de 50 a 100 µl do meio no tubo, o qual é homogeneizado completamente com o “pellet” de bactérias. A este homogeneizado adicionou-se 300 µl de TENS (TE 10 X; NaOH 5M; SDS 20% e água estéril), homogeneizando-se a mistura por 5 segundos. À mistura adicionou-se 150 µl de acetato de sódio pH 5,2, homogeneizando-se novamente por 5 segundos, e centrifugando-a por 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo eppendorff novo, e a este foram adicionados 900 µl de etanol absoluto, homogeneizando-se a mistura por inversão, e centrifugando-se por mais 2 minutos à temperatura ambiente. O “pellet” foi lavado duas vezes com etanol 70% e colocado para secar. Uma vez

seco, o “pellet” foi ressuspenso em um volume de 25 a 50 μ l de TE 1X e incubado com 1 μ l de RNase (1mg/ml) para cada 25 μ l de TE 1X por 10 minutos a 37°C.

Para a liberação dos insertos clonados a fim de se verificar se estavam corretos, 2 μ l de cada plasmídeo foram digeridos com 1 unidade da enzima *Not I* (50 U/ μ l - Gibco BRL), em um volume final de 10 μ l.

c) Seqüenciamento automático

Os clones contendo os insertos de interesse foram enviados ao Laboratório de Genômica e Expressão, do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, para realização do seqüenciamento automatizado no equipamento ABI 377 (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas por intermédio do kit Big Dye (Applied Biosystems), com os iniciadores M13 direto e reverso.

4) ISOLAMENTO DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E SUA REGIÃO PROMOTORA EM *EPTATRETUS SP.*

Para o estudo do vertebrado primitivo *Eptatretus sp.*, inicialmente realizamos extrações de DNA e RNA de amostras que nos foram gentilmente cedidas pelo Dr Roberto Ávila, do Instituto Oceanográfico da USP. Porém, os resultados obtidos não foram adequados, uma vez que tanto o DNA quanto o RNA estavam degradados. Como a estratégia inicial consistia da construção de uma biblioteca de cDNA para a clonagem do gene RA, e posterior construção de uma biblioteca genômica para a clonagem do promotor deste gene, havia a necessidade se ter tanto RNA quanto DNA de excelente qualidade para que se pudesse proceder com tais técnicas.

A fim de obter um material o mais íntegro e fresco possível para a realização das novas extrações de RNA e DNA eu embarquei, dos dias 13 a 27 de outubro de 1998 no cruzeiro de pesquisa a bordo do navio Soloncy Moura, a serviço do IBAMA (CEPSUL/Itajaí/SC). Participaram do cruzeiro os pesquisadores do projeto REVIZEE (Ministério do Meio Ambiente) responsáveis pela porção sul, englobando assim os pesquisadores de Itajaí e os do Instituto Oceanográfico da USP.

O cruzeiro se deu na costa do Estado do Rio de Janeiro, sendo algumas das coletas realizadas em águas internacionais, pois chegamos a nos distanciar 270 milhas náuticas da costa (1 milha náutica corresponde a 1,8Km). Apenas em dois dos oito pontos escolhidos para o lançamento das pargueiras e armadilhas (as quais ficavam submersas por 12 horas) foram capturados dois animais (um em cada localidade), ambos fêmeas. Estes dois pontos eram justamente os de maior profundidade do cruzeiro, sendo que o primeiro animal (um *Myxine*) foi coletado a 1000 metros de profundidade e o segundo (um *Eptatretus*), a 600 metros. Os animais chegaram vivos à superfície e foram abertos a bordo para a retirada de

tecidos (ovos, oviduto, cérebro, fígado, músculo, sangue e coração). Tais tecidos foram colocados nos tubos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para a sua total preservação.

Com este novo material, procedeu-se novamente à extração de RNA e DNA de *Eptatretus sp.*, conforme os protocolos descritos a seguir.

a) Extração de RNA

Precipitação de proteína:

Para todos os tecidos utilizados na extração de RNA (ovos, oviduto, cérebro, fígado, músculo, sangue e coração) procedeu-se da mesma forma: o tecido foi picado em pequenos pedaços, por intermédio de uma lâmina de bisturi estéril, em uma placa de Petri sobre gelo. Para cada 100 mg de tecido utilizou-se 1 ml de TRIzol (Gibco BRL), incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, acrescentou-se 0,2 ml de clorofórmio por ml de TRIzol utilizado, homogeneizando-se vigorosamente, e incubando-se novamente, desta vez por 3 minutos, à TA. Após esta segunda incubação, centrifugou-se o material por 20 minutos a 13.000 rpm, a 8°C.

Precipitação do RNA:

A fase aquosa, formada após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação, por 10 minutos à temperatura ambiente, com 0,5 ml de isopropanol (por ml de TRIzol utilizado inicialmente). Após este período o material foi novamente centrifugado a 13.000 rpm, por 10 minutos, à TA. O “pellet” formado foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 8°C. O “pellet” de RNA formado foi seco à TA, ressuspenso em água estéril tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), e incubado a 60°C por 10 minutos para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase.

b) Northern Blot

Todo o aparato utilizado para a confecção e corrida do gel foi previamente tratado com água oxigenada 10% por 20 minutos e lavado com água com DEPC estéril. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,5%, contendo 6% de formaldeído 37%, utilizando-se como tampão de corrida MOPS 1X (ácido propanosulfônico 3-N-Morfolino), diluído com água com DEPC a partir de um estoque de 10X. O formaldeído, por ser tóxico, foi o último a ser acrescentado, em capela de exaustão.

Cerca de 6 μ l de cada amostra de RNA foram misturados a 13 μ l de tampão de desnaturação (MOPS 10X; formaldeído 37%; formamida desionizada; água com DEPC; azul de bromofenol e brometo de etídio), e incubados a 55°C por 15 minutos. Após este período de tempo as amostras foram imediatamente transferidas para um banho de gelo e aplicadas no gel, sendo submetidas a eletroforese a 80 V por 2 horas.

O gel foi fotografado, lavado por 15 minutos em água com DEPC sob leve agitação, e colocado em aparato de transferência contendo tampão SSC 2X (sal de citrato de sódio), sendo a transferência para a membrana de ácidos nucleicos Hybond™-N+ - Amersham feita “overnight”. A membrana foi, após a transferência, lavada por 15 minutos em SSC 2X sob leve agitação, seca em papel de germinação sobre a bancada por 30 minutos, e incubada por duas horas em forno a 80°C, permitindo assim a fixação do ácido nucleico.

A segunda sonda, de aproximadamente 350 pb, foi obtida por meio da amplificação da região conservada do gene RA com o par de iniciadores aAR (segundo YOUNG *et al.*, 1995), e o cDNA utilizado como molde foi o obtido por transcrição reversa do RNA de testículo de camundongo, extraído por intermédio do reagente TRIZol (Gibco BRL). A seqüência dos iniciadores aAR é: aAR Sense: 5' TGTTACGAGGCCGGGATGAC 3' e aAR antisense: 5' CCAGCCCATAGCAAAGACCAT 3'.

Em ambos os casos 45 µl de cada sonda foram adicionados a 9 µl de Azul de Bromofenol e corridos em gel de agarose a 1,5% com TAE 1X até que se obtivesse uma boa separação. Assim, as bandas correspondentes às sondas foram cortadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e purificadas por intermédio do Kit Concert™ Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL).

A área do gel contendo o fragmento a ser purificado foi cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e pesada, pois para cada 10 mg de gel acrescenta-se 30 µl do tampão de solubilização de gel L1 (o qual contém perclorato de sódio concentrado, acetato de sódio e um TBE solubilizer™). Este tampão, no qual o pedaço do gel ficou imerso, foi mantido por 20 minutos em banho a 50°C, sendo homogeneizado periodicamente.

Após a completa solubilização do gel todo o conteúdo do tubo foi transferido para uma coluna acoplada a um cartucho coletor e centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm, à TA. Descartou-se o líquido recolhido no cartucho e fez-se uma segunda lavagem da coluna com mais 500 µl de tampão L1, incubando-o por 1 minuto à TA e novamente centrifugando por 1 minuto a 12.000 rpm.

O líquido recolhido foi descartado e adicionou-se à coluna 700 µl do tampão de lavagem L2 (o qual contém NaCl, EDTA, Tris-HCl e etanol absoluto), incubando-a por 5 minutos à TA, e centrifugando por 1 minuto a 12.000 rpm. O líquido recolhido foi descartado e, para se garantir que todo o tampão L2 foi eluído da coluna, centrifugou-se por mais 1 minuto a 12.000 rpm. Nesta etapa o DNA está pronto para ser eluído. Assim, adicionou-se na coluna de 30 a 50 µl de TE 1X (previamente aquecido a 65-70°C), a qual foi transferida para um tubo eppendorff estéril (a fim de se coletar o DNA), incubada por 1 minuto e centrifugada por 2 minutos a 12.000rpm, à TA.

b.2) Marcação das sondas

As sondas foram marcadas utilizando-se o kit RadPrime DNA Labelling System (Gibco-BRL). Cerca de 25 ng de sonda, em um volume final de 20 µl, foram desnaturadas por 5 minutos, sendo transferidas, após este tempo, imediatamente para um banho de gelo. A reação, realizada a seguir, é também feita em banho de gelo. Aos 20 µl da sonda desnaturada adicionou-se: 1 µl de dATP 500 µM, 1 µl de dGTP 500 µM, 1 µl de dTTP 500µM, 20 µl de "random primers solution" 2,5X, 5 µl (50 mCi) [α -³²P]dCTP, 3000Ci, 10 mCi/ml, e 1 µl de Klenow Fragment. Misturou-se levemente e centrifugou-se por 30 segundos.

Em aparato acrílico a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, adicionando-se logo em seguida ao tempo de incubação 5 µl de Stop Buffer (EDTA 0,5M pH 8,0), e completando-se o volume para 100µl com TE. Os nucleotídeos não incorporados são, então, eliminados através da passagem por uma coluna de Sephadex G-50. Em seguida, estimou-se a radioatividade de 1µl em um contador de cintilação líquida e calculou-se a eficiência da incorporação. Todo o trabalho realizado com radioisótopos foi monitorado com um monitor de radiação do tipo Geiger.

b.3) Hibridização da membrana

Pré-hibridização: os filtros foram incubados em solução de pré-hibridização (Formamida 50%; SSC 5x; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; Denhardt's 10x; SDS 1%; ssDNA 200 µg/ml - desnaturar e adicionar o ssDNA na hora do uso - solução conservada a 4°C em frasco protegido da luz com papel alumínio) por 18 horas a 42°C.

Hibridização: a solução de pré-hibridização foi substituída pela de hibridização, conservada a 4°C em frasco protegido da luz com papel alumínio (Formamida 50%; SSC 5X; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; Denhardt's 2X; SDS 1%; Sulfato de dextrana 25%; ssDNA 200 µg/ml - desnaturado e adicionado na hora do uso) contendo aproximadamente 2×10^6 cpm/ml da sonda, incubando-se cerca 18 horas a 42°C.

Lavagem dos filtros: após a hibridização o filtro foi lavado uma vez em uma condição de baixa estringência (SSC 2X; SDS 0,1%) à temperatura ambiente para retirada do excesso de sonda, por 15 minutos e, duas vezes em condições de alta estringência (SSC 0,1X; SDS 0,1%) a 65°C, por 20 minutos.

Auto-radiografia: o filtro lavado foi exposto a filmes de raio-X (Kodak X-OMAT AR) em cassetes apropriados com intensificador de sinal ("Lightning Plus" da Dupont), a -70°C.

c) Transcrição de RNA

O RNA extraído foi diluído em água tratada com DEPC, em um volume final de 10 μ l (1:1) e aquecido a 65°C por 3 minutos, sendo imediatamente transferido para um banho de gelo.

Ainda em gelo adicionou-se o mix contendo: 4 μ l de tampão 5X, 1 μ l de RNAsin (10U), 1 μ l de óligo dT (0,5 μ g), 1 μ l de mix de iniciadores randômicos (0,5 μ g), 2 μ l de dNTPs (2mM) e 1 μ l da enzima AMV reverse transcriptase. Esta mistura foi incubada a 42°C por 1 hora, seguida de 30 minutos a 52°C.

d) RACE (Rapid Amplification for cDNA Complete Ends)

d.1) Kit Gibco BRL

O RNA de oviduto, em uma concentração mínima de 1 μ g, é diluído em um volume final de 13 μ l de água destilada tratada com DEPC. Neste tubo adiciona-se 1 μ l do iniciador adaptador (5' GGCCACGCGTCGACTAGT₁₇ 3'), numa concentração de 10 μ M. Esta mistura é aquecida a 65°C por 10 minutos, passando imediatamente para um banho de gelo, onde permaneceu por 2 minutos, seguido de centrifugação.

Após a centrifugação são adicionados 2 μ l do tampão de síntese 10X; 1 μ l do mix de dNTPs a 10mM e 2 μ l de DDT a 0,1 M, gentilmente misturados, centrifugados momentaneamente e colocados por 2 minutos a 42°C. Adicionou-se 1 μ l de SuperScript RT (200U/ μ l) e a mistura permaneceu a 42°C por mais 50 minutos. Após este tempo as amostras foram retiradas, novamente centrifugadas e colocadas em banho de gelo para a adição de 1 μ l de RNase H (2U/ μ l), incubando-se novamente a 37°C por 20 minutos.

Este cDNA obtido foi usado como molde na seguinte amplificação: 35,25 µl de H₂O; 5 µl de Tampão 10X; 1,5 µl de MgCl₂ (50mM); 5 µl de dNTPs (2mM); 1 µl do iniciador rsARsense (5' CGGGATCCGARGGNAARCARAARTA 3'), 1 µl do iniciador universal (5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTCGACTAGTAC 3'), 1 µl de DNA e 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Gibco BRL – 5U/µl). A temperatura de anelamento usada foi de 50 °C. O par de iniciadores rsAR, de truta, foram descritos por TOUHATA *et al.*, 1999.

d.2) SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech)

Síntese da primeira fita de cDNA (5' – RACE- Ready cDNA)

Foram misturados a 2 µl da amostra de RNA, extraído de oviduto de *Eptatretus sp.*, e cuja concentração era de 100ng/µl, 1 µl do iniciador 5' CDS (*RACE cDNA Synthesis Primer*) 10µM (5' T₂₅NN 3'), 1 µl de SMART II oligo 10µM (5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG 3'), e 1 µl de água, centrifugando-os brevemente. Esta reação foi incubada a 70°C por 2 minutos, sendo passada imediatamente após este tempo para um banho de gelo por mais 2 minutos. O tubo contendo a reação foi novamente centrifugado e adicionou-se aos 5 µl de reação iniciais 2 µl de tampão "First-strand" 5X, 1 µl de DTT (20 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM), e 1 µl de MMLV transcriptase reversa (200U/µl). A reação foi misturada e centrifugada antes de ser incubada a 42°C por uma hora e meia. Como se partiu de 200ng de RNA, à reação descrita foram adicionados 20 µl de tampão TE 1X, aquecendo-se por 7 minutos a 72°C. Alíquotas da amostra foram estocadas em freezer –20°C.

Em uma segunda etapa do protocolo, essa primeira fita de cDNA sintetizada foi utilizada como molde para uma reação de PCR. Nessa reação

adicionou-se aos 2,5 μ l do cDNA 5' RACE: 34,5 μ l de H₂O, 5 μ l de tampão PCR "Advantage 2" 10X, 1 μ l de dNTPs MIX (10mM), 1 μ l de "Advantage 2 Polimerase MIX 50X" 5 μ l do iniciador universal 10X (5' CTAATACGACTCACTATAGGGC), e 1 μ l do iniciador gene-específico sense (GSP-sense – 5' GAAGGCAAACAGAAATACCTGTGCGC 3').

Para o desenho da seqüência desse iniciador, seqüências referentes à região de ligação ao DNA de vários animais, disponíveis no GeneBank foram alinhadas. Isso foi feito com o intuito de se obter um iniciador que amplificasse esta região, a mais conservada do gene RA, em todas as espécies. Como a T_m do iniciador gene-específico era maior que 70°C, foram programados: 5 ciclos a 94°C por 30 segundos e a 72°C por 3 minutos; 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 70°C por 30 segundos e a 72°C por 3 minutos; e 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 68°C por 30 segundos e a 72°C por 3 minutos. Os fragmentos resultantes desta amplificação foram purificados de gel de agarose 0,8% e clonados em vetor pGEM para posterior seqüenciamento.

e) Extração de DNA

Em uma placa de Petri sobre gelo cerca de 500 mg de tecido foram picados com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril. O material foi transferido para um tubo Falcon, misturado a 5ml de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1 M pH 8,0; Proteinase K 100ug/ml; e SDS 0,1%), e levado ao agitador a 56°C "overnight".

Após o período de incubação acrescentou-se um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) igual ao da solução homogeneizada, deixando sob agitação suave por 30 minutos. Logo após o período de incubação, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos à TA.

Ao sobrenadante foram acrescentados 0,1 volume de acetato de amônio 3,0 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado misturando-se lentamente por inversão para a precipitação do DNA, o qual foi retirado com uma vareta de inocular bactérias. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco à TA, e ressuspensão em TE 1X contendo RNase (100ug/ml). Para o tratamento com RNase o DNA foi incubado a 37°C por 1 hora, sendo a enzima posteriormente inativada a 70°C por 10 minutos.

f) Curva de cinética de digestão parcial de DNA genômico

O DNA genômico foi submetido a digestões parciais subsequentes para se obter uma curva de cinética de digestão com a enzima *Mbo* I. Esta cinética tinha como intuito escolher os melhores tempos de digestão, os quais gerariam fragmentos de DNA com tamanhos compatíveis aos necessários para a ligação com o cosmídeo Lawrist 4, gentilmente cedido pelo Dr Hoheisel. O cosmídeo foi preparado segundo protocolo do pesquisador, descrito no ítem 4.8.

Inicialmente preparou-se 10 tubos contendo uma solução de parada de reação, a qual continha: 3 µl de EDTA 500mM, 2 µl de Azul de Bromofenol e 5 µl de água MilliQ. A estes tubos foram adicionados, após os períodos de incubação correspondentes descritos abaixo, 5 µl da reação de digestão.

A reação de digestão, realizada em um volume final de 50 µl, continha: 40 µl de DNA genômico (para se ter uma concentração final de aproximadamente 1,5 µg de DNA), 7,5 µl de tampão da enzima (o fabricante indica o uso de tampão 1,5X), 1 µl (5U) da enzima *Mbo* I (Stratagene) e 1,5 µl de água estéril para completar o volume final. A reação foi realizada a temperatura de 37°C.

Antes da reação de digestão ser colocada em banho a 37°C, foi retirada a primeira alíquota de 5 µl, a qual foi adicionada ao primeiro tubo com a solução de

parada de reação. Após 30 segundos foi retirada a segunda alíquota; a 1 minuto a terceira; a 1 minuto e 30 segundos a quarta; a dois minutos a quinta; a 2 minutos e 30 segundos a sexta; a 3 minutos a sétima; a 4 minutos a oitava; a 8 minutos a nona; e por fim a última alíquota foi retirada aos 30 minutos.

Os 15 μ l (resultantes da mistura de reação de digestão com a solução de parada) retirados nos diferentes tempos foram aplicados em um gel de agarose 0,5% (em TAE 1X) e corridos a 40 V “overnight”. Como marcador aplicou-se 50 ng de λ DNA (Gibco BRL) na primeira linha do gel, pois o DNA de λ tem o tamanho conhecido (40 Kb). O gel foi corado em Brometo de Etídio e fotografado.

g) Preparação do Cosmídeo Lawrist 4

Os cosmídeos da série Lawrist foram descritos por de DE JONG *et al.* (1994). Cerca de 100 μ g do vetor foram dissolvidos em 340 μ l de água destilada para que se procedesse à digestão. Para tal foram acrescentados 40 μ l do tampão 10X apropriado e 20 μ l da enzima de restrição Sca I (10U/ μ l). A digestão foi realizada “overnight”.

Uma alíquota da digestão foi verificada em gel de agarose 0,8%, sendo adicionado 2 μ l de fosfatase alcalina (1U/ μ l – Boehringer Mannheim) e incubado por 1 hora a 37°C. Após este período mais 2 μ l de fosfatase foram adicionados, e a temperatura de incubação elevada para 56°C, por mais 30 minutos. Para a inativação da enzima a reação é colocada por 10 minutos a 70°C. Foram ainda adicionados 10 μ l de EDTA 0,5M, 10 μ l de SDS 20% e 5 μ l de Proteinase K (10mg/ml) e novamente incubada a reação por 30 minutos a 56°C.

A reação foi submetida a uma extração com fenol-clorofórmio (450 μ l), sendo centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. À fase aquosa, foi adicionado o

mesmo volume de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1). As fases foram novamente separadas por uma breve centrifugação, e a fase aquosa (superior) retirada para ser precipitada “overnight”, por intermédio da adição de 10% do volume final de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol gelado.

A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e dissolvida em 160 µl de água MilliQ. Para que se procedesse à digestão foram adicionados 20 µl do tampão 10X correspondente à enzima *Bam* HI e 20 µl desta, a uma concentração de 20U/µl. A digestão foi realizada por, no mínimo, 2 horas a 37°C, e verificada em gel de agarose 0,8%. Assim, tendo-se o vetor totalmente digerido este foi extraído uma vez com fenol e outra com clorofórmio / álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi precipitada com 20 µl de acetato de sódio 3M e 450 µl de etanol gelado “overnight” e centrifugada por 20 minutos a 4°C. O “pellet” foi lavado com 200 µl de etanol 70%, seco a temperatura ambiente e dissolvido em 100 µl de água MilliQ.

h) Construção de Biblioteca Genômica em cosmídeo Lawrist 4

Em um volume final de 200 µl, foram colocados 35 µg de DNA, 20 µl de tampão 10X (New England Biolabs 4) e 1 µl de *Mbo* I (5U/µl), incubando-se a 37°C. Três alíquotas de 66 µl foram retiradas, respectivamente, nos tempos 2, 2,5 e 3 minutos. Logo após a retirada de cada alíquota foi acrescentado a cada tubo o mesmo volume de EDTA 50mM para a finalização da reação. A enzima, por sua vez, foi inativada por calor (68°C por 10 minutos). O DNA de cada alíquota foi extraído com fenol-clorofórmio (v/v) e precipitado com 6 µl de NaCl 5M e 240 µl de etanol absoluto. Após uma hora em freezer -20°C, centrifugou-se por 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C.

Os “pellets” de DNA foram ressuspensos em 44 μ l de água MilliQ, acrescentando-se a cada tubo 5 μ l de tampão 10X e 1 μ l de fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim – 1U/ μ l). Esta reação foi incubada por 1 hora a 37°C e por subsequentes 30 minutos a 56°C, sendo interrompida por inativação da enzima ao ser exposta a 70°C por 10 minutos. Após este período acrescentou-se 2 μ l de EDTA 500mM, 2 μ l de SDS 20% e 2 μ l de Proteinase K (10mg/ml) e incubou-se a por 30 minutos a 56°C. Novamente o DNA foi extraído com fenol (v/v) e clorofórmio – álcool isoamílico (v/v) separadamente, e precipitado com 1/25 volume de NaCl 5M e 2 volumes de etanol absoluto. Após uma hora o DNA foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm, lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 14 μ l de água MilliQ, ficando em uma concentração final de 500 ng/ μ l. Juntou-se as três amostras em um só tubo, e 5 μ l desta foi misturada a 2 μ l do vetor Lawrist 4 preparado, 2,6 μ l de tampão de ligação 10X e 0,9 μ l de ATP 100mM, e ajustando-se o volume final de 25 μ l com água e 1 μ l de T4 DNA ligase (1U/ μ l – Gibco BRL). Esta reação de ligação foi incubada a 15°C “overnight”.

Esta ligação do vetor como inserto foi empacotada em partículas de fago lambda. Para isso utilizou-se o Gigapack III XL Packaging Extract (Stratagene), sendo acrescentado a este 4 μ l da ligação sem que nenhuma bolha de ar fosse introduzida, e incubando-se por 2 horas a temperatura ambiente. Como controle positivo, empacotou-se o DNA de fago lambda.

Após as duas horas adicionou-se 500 μ l de tampão SM (NaCl; MgSO₄; Tris-HCl), homogeneizando por leve inversão, e 20 μ l de clorofórmio, invertendo-se o tubo novamente algumas vezes. Centrifugou-se rapidamente e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. O DNA empacotado deve ser armazenado a 4°C, podendo permanecer nesta temperatura por várias semanas.

Para o preparo da bactéria hospedeira, inoculou-se 500 μ l do pré-inóculo de DH5 α em 50 ml do meio 2YT (1,6% Bacto triptona; 1% de extrato "bacto yeast"; 0,5% de NaCl) contendo 500 μ l de MgSO₄ 1M e 500 μ l de maltose 20%. O inóculo cresceu por 6 horas a 37°C, sendo centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C após este período. O "pellet" formado foi ressuspenso em 10 ml de MgSO₄ 10mM estéril. A densidade ótica (DO) destas células foi determinada em 600nm de comprimento de onda, e diluída novamente em MgSO₄ 10mM, de forma a se obter uma DO₆₀₀ de 1.

Diluiu-se 20 μ l da solução estoque de fago em 180 μ l do tampão SM. Esta diluição foi feita novamente para que se tivesse uma diluição de 1:100. Misturou-se 10 μ l de cada diluição de fago a 200 μ l de solução de bactérias hospedeiras, incubando-se a 37°C por 15 minutos em "shaker" a 100 rpm para que os fagos se aderissem às células. Adicionou-se 1ml de meio 2YT pré-aquecido e manteve-se por mais 1 hora a 37°C. Os fagos complexados às bactérias foram misturados a Top agarose 0,3% e plaqueados em meio 2YT/Kanamicina para se realizar a titulação do banco.

i) Southern Blot

Para a obtenção da membrana (blot), os DNAs digeridos "overnight" (em temperaturas e concentrações ideais, indicadas pelos fabricantes) com as nove enzimas de restrição (*Ava* I, *Taq* I, *Hinf* I, *EcoR* I, *Xba* I, *Kpn* I, *Pvu* II, *Pst* I, e *BamH* I) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%, sendo a migração feita a 5V/cm. Em seguida o gel foi corado com brometo de etídio por 30 minutos, fotografado e lavado, sob leve agitação.

Em seguida o gel foi tratado com HCl 0,25N por 15 minutos (para que houvesse depuração), lavado novamente em água destilada, tratado com NaOH 0,4N / NaCl 1M por 30 minutos (para que houvesse a desnaturação do DNA), e posto em um aparato de transferência, sendo o veículo de transferência a própria solução de desnaturação. Sobre o gel colocou-se uma membrana de transferência de ácidos nucleicos (Hybond™-N+ - Amersham), duas folhas de papel Whatman 3MM e grande quantidade de papel absorvente (aproximadamente 6 cm). A transferência foi realizada "overnight". No dia seguinte a membrana foi neutralizada com tampão fosfato de sódio 0,1M por 30 minutos sob agitação e seca ("queimada") a 80°C por 2 horas.

Inicialmente esta membrana foi hibridizada com o gene RA de truta (rsAR – figura 5), cujo plasmídeo contendo o cDNA do gene nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Ken Touhata, da Universidade de Kyoto, Japão. Para a liberação do inserto foi feita uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Eco R I* e *Hind III*.

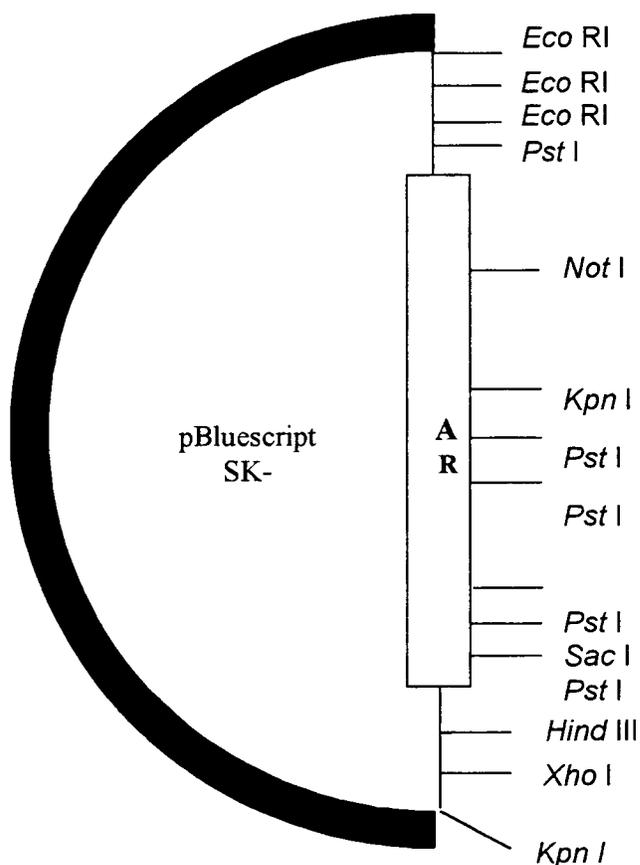


Figura 5: Mapa do plasmídeo pBluescript SK- rsAR

Porém, como o resultado da hibridização não foi satisfatório, um par de iniciadores, rsAR sense (TOUHATA *et al.*, 1999) e GSP anti-sense (5' GCGCACAGGTATTTCTGTTTGCCTTC 3'), foi usado para amplificar a região conservada do gene AR de truta. Essa amplificação pela PCR teve como intuito a obtenção de um fragmento (em torno de 700pb), referente à tal região do gene RA de truta, a ser utilizado como sonda. Novamente, para a obtenção do iniciador GSP anti-sense procedeu-se da mesma forma: seqüências referentes à região de ligação ao DNA de vários animais, disponíveis no GeneBank foram alinhadas para que se desenhasse um iniciador que anelasse na região mais conservada do gene.

j) Mini banco construído com DNA digerido com *Pvu* II

A hibridização da membrana com a sonda de 700 pb gerada por PCR revelou a presença de várias bandas, correspondentes ao gene RA em *Eptatretus sp.*. Assim, escolheu-se a banda referente à hibridização com a digestão com *Pvu* II, por ter um tamanho pequeno (menor que 1kb) e por esta enzima produzir cortes abruptos, o que facilita a ligação com o vetor.

Assim, cerca de 10 µg de DNA foi digerido "overnight" com 30 unidades da enzima *Pvu* II. Esta digestão foi precipitada com 0,1 volume de NaAc 3M e 3 volumes de etanol absoluto, sendo ressuspensa em 20 µl de TE 1X. Todo o volume foi aplicado em um gel de agarose 0,8% e corrido por cerca de 40 minutos. Todo o DNA cujo tamanho estava entre 0,5 e 1 kb foi cortado do gel e purificado com o auxílio do kit Concert™ Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL). Este DNA, utilizado como inserto, foi ligado ao vetor pUC 18, componente do kit Sure Clone (Amersham Pharmacia), segundo as instruções do fabricante. Foram realizadas quatro reações, sendo que em duas usou-se 4 µl de inserto e nas outras duas, 7 µl.

O fragmento a ser ligado deve ser purificado e quantificado. A massa requerida de DNA para a ligação é designada de acordo com o tamanho do inserto (tabela apresentada no kit). Os fragmentos foram submetidos ao tratamento de preenchimento e fosforilação, por intermédio da seguinte reação:

Produto de PCR	1-16 μ l
Klenow fragment	1 μ l
10X Blunting/ Kinasing buffer	2 μ l
Polinucleotide kinase	1 μ l
H ₂ O destilada	qsp 20 μ l
Volume total	20 μ l

Esta reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após este período foram adicionados 20 μ l de fenol/clorofórmio, vortexado e centrifugado por um minuto. A fase aquosa foi coletada e passada pela coluna de purificação. Esta coluna contém a resina Sephacryl S-200 (500 μ l), a qual se ligará ao DNA presente na fase aquosa coletada na etapa anterior. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 segundos e a coluna descartada. 2 μ l do efluente recolhido foram utilizados na ligação com o vetor, seguindo-se a reação:

Efluente da coluna	2 μ l
Vetor desfosforilado (50ng)	1 μ l
Tampão de ligação 2X	10 μ l
Solução de DTT	1 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l
H ₂ O destilada	qsp 20 μ l
Volume final	20 μ l

Dos 20 μl de volume final de cada reação, cerca de 5 μl foram utilizados por vez para a transformação de células competentes. A transformação foi feita por choque térmico por 1 minuto a 42°C, seguido por resfriamento em gelo e crescimento por 1 hora em “shaker” a 37°C, para subsequente plaqueamento em meio LB ágar com ampicilina e X-Gal.

Cerca de 500 clones recombinantes foram inoculados em meio LB, crescidos “overnight” sob agitação a 37°C, e a estas culturas de células obtidas procedeu-se às extrações de plasmídeo por mini-preparação. As 500 amostras de DNA plasmidial obtidas foram testadas em gel de agarose 0,8 % para a quantificação da concentração de cada uma delas, para que se pudesse passar para a próxima etapa de fixação dos DNAs em membrana (macroarray) e posterior hibridização. Assim, todos os DNAs plasmidiais foram digeridos de forma a ficarem com a mesma concentração de 100ng/ μl . Esta concentração foi novamente alterada quando se partiu para a fixação dos DNAs em membrana. As amostras foram diluídas em NaOH (em uma concentração final de 0,2M) para que ficassem com uma concentração final de 50ng/ μl , e aquecidas a 37°C por 15 minutos para que se procedesse ao preparo da membrana.

As amostras foram colocadas em placas de 96 poços em fundo cônico, juntamente com o NaOH. O carimbo, com também 96 “capilares”, era encaixado na placa e pela marcação guia, levemente pressionado na membrana. Este procedimento era repetido para cada placa, de modo a se obter uma concentração final de 100 ng de cada amostra na membrana. Cada amostra foi “carimbada” em duplicata. Assim, obteve-se uma única membrana com 500 amostras em duplicata, distribuídas de forma que as amostras iguais não ficassem próximas. A membrana foi colocada por 2 horas em forno a 80°C a fim de se fixar o ácido nucleico, pré-hibridizada por uma hora e hibridizada com a sonda GSP sense/rsAR anti-sense, de 700 pb, “overnight”. Os pontos mais fortes foram manualmente seqüenciados com o kit Thermosequenase (Amersham Pharmacia) e as seqüências obtidas submetidas ao Blast.

k) Isolamento de banda-Southern / PCR / Clonagem com pGEM T easy

Na tentativa de se isolar o gene RA, também se tentou restringir a quantidade de DNA. Para isso, algumas bandas relativas às hibridizações com a sonda GSP sense/rsAR anti-sense foram isoladas de gel de agarose 0,8% com o auxílio do kit Concert™ Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL). O DNA assim obtido foi usado como molde para a amplificação pela PCR. A condição de amplificação utilizada encontra-se na tabela 3. Vários pares de iniciadores também foram utilizados, encontrando-se as seqüências na tabela 3, e as combinações dos mesmos na tabela 4. A condição de amplificação usada foi a seguinte: 35,25 µl de H₂O; 5 µl de Tampão 10X; 1,5 µl de MgCl₂ (50mM); 5 µl de dNTPs (2mM); 1 µl de cada iniciador (sense e anti-sense), 1 µl de DNA e 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Gibco BRL – 5U/µl). A temperatura de anelamento usada foi de 50 °C.

Os fragmentos obtidos pela PCR foram clonados com o auxílio do kit pGEM T easy vector da Promega, e os clones recombinantes seqüenciados também manualmente. As seqüências lidas foram submetidas a comparação com o banco de dados do GeneBank por intermédio do BLAST.

Tabela 3: Seqüências dos iniciadores aAR (sense e antisense), rsAR (sense e antisense) e degenerados (sense e antisense).

Iniciador	Seqüência
GSP sense	GAAGGCAAACAGAAATACCTGTGCGC
GSP antisense	GCGCACAGGTATTTCTGTTTGCCTTC
rsAR sense	CGGGATCCGARGGNAARCARAARTA
rsAR antisense	ATGGATCCNGCYTTCATNARRAAYTC
aAR sense	TGTTACGAGGCGGGGATGAC
aAR antisense	CCAGCCCATAGCAAAGACCAT
aAR degenerado sense	TGYCAGCCYATCTTYCTSA
aAR degenerado antisense	TCWGVYCWTCACWKGMAGCGC

N = A/T/G/C
R = A/G
Y = C/T
S = G/C
W = A/T
V = A/C/G
K = G/T
M = A/C

Tabela 4: Combinação de iniciadores utilizada para a amplificação de fragmentos onde houve a restrição de tamanho do DNA genômico de *Eptatretus sp.*

Sense	Antisense	aAR	rsAR	GSP	Degenerado
aAR		X		X	X
rsAR			X	X	X
GSP		X	X		
Degenerado					X

Resultados

RESULTADOS

1) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em Doadores de Sangue

A reação de PCR, realizada para amplificar a região promotora do gene RA, apresentou apenas uma banda amplificada, de tamanho esperado, para cada um dos quatro pares de iniciadores usados (tabela 1), em todos os 100 indivíduos doadores de sangue analisados. Nas figuras 6 a 9 podem ser observados os produtos de amplificação relativos à cada par de iniciadores, de alguns indivíduos, com o tamanho do fragmento indicado.



Figura 6: Fragmentos gerados por amplificação pela PCR com os iniciadores 10S/2 (PM = peso molecular de 100 pb – Gibco BRL).

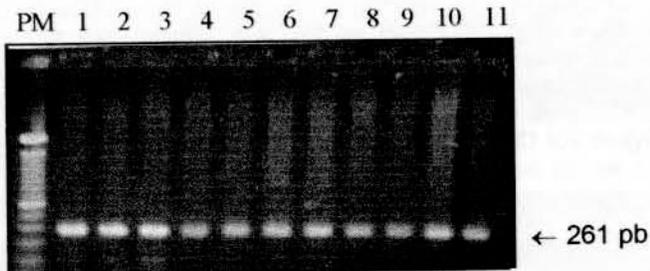


Figura 7: Fragmentos gerados por amplificação pela PCR com os iniciadores 3C/4C (PM = peso molecular de 100 pb – Gibco BRL).

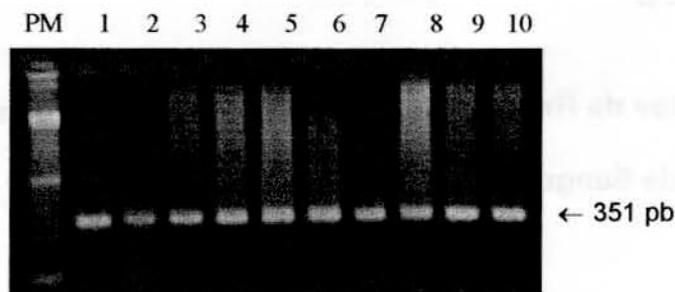


Figura 8: Fragmentos gerados por amplificação pela PCR com os iniciadores 1C/2C (PM = peso molecular de 100 pb – Gibco BRL).

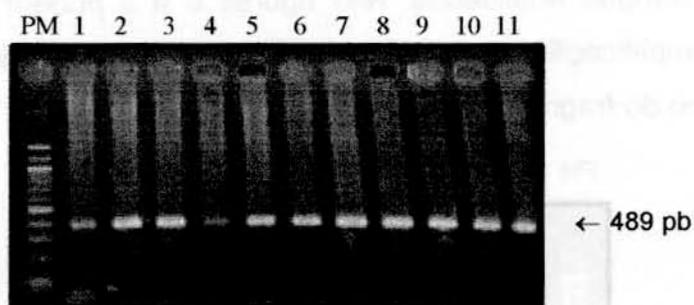


Figura 9: Fragmentos gerados por amplificação pela PCR com os iniciadores 776/1245. (PM = peso molecular de 100 pb – Gibco BRL).

Inicialmente o rastreamento de alterações moleculares nos fragmentos amplificados foi realizado por intermédio da técnica de SSCP. As condições testadas para todos os fragmentos amplificados encontram-se descritas em Material e Métodos. Porém, em nenhum dos DNAs analisados dos 100 indivíduos doadores de sangue foi detectada alteração de migração por SSCP.

Na figura 10 acha-se representado um gel de SSCP, correspondendo ao padrão de migração do produto de PCR dos iniciadores 3C/4C, de alguns indivíduos do grupo de doadores.

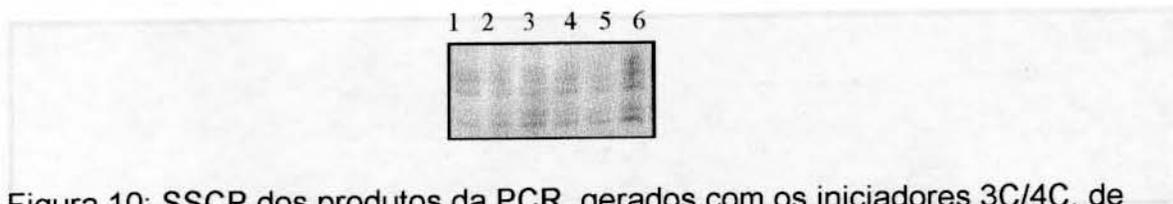


Figura 10: SSCP dos produtos da PCR, gerados com os iniciadores 3C/4C, de alguns indivíduos doadores, sem alteração de migração.

A técnica de CSGE, realizada com os produtos de amplificação de 100 amostras detectou alguns padrões diferenciais de migração, o que poderia representar a existência de alguma alteração molecular. Para que tal fato fosse confirmado, os amplificados que apresentaram alteração de migração foram manualmente seqüenciados. Foram detectadas 3 alterações de migração com os iniciadores 10S/2 (figura 11), 1 com os iniciadores 1C/2C (figura 12), e 1 com os iniciadores 3C/4C (figura 13). Nenhuma alteração de migração foi detectada com o par de iniciadores 776/1245 (figura 14).

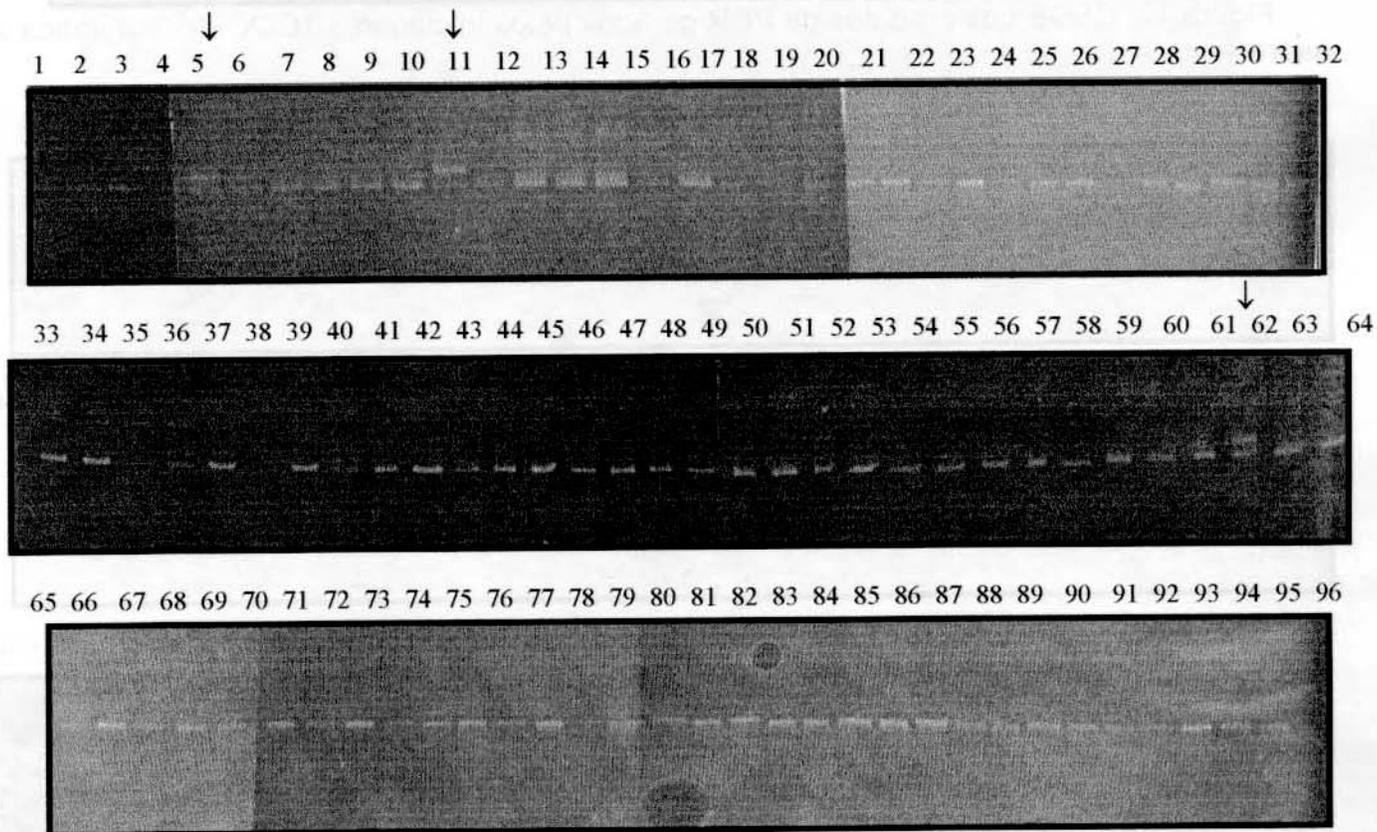
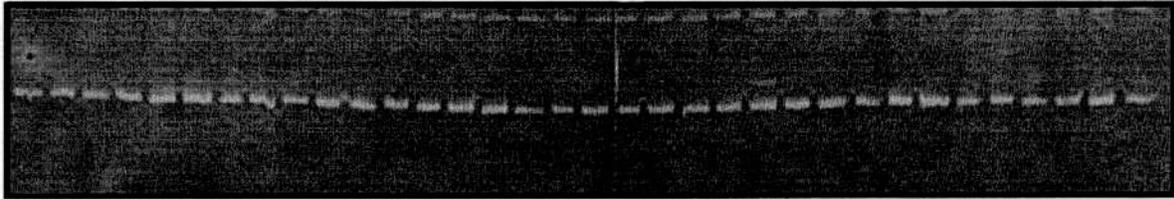
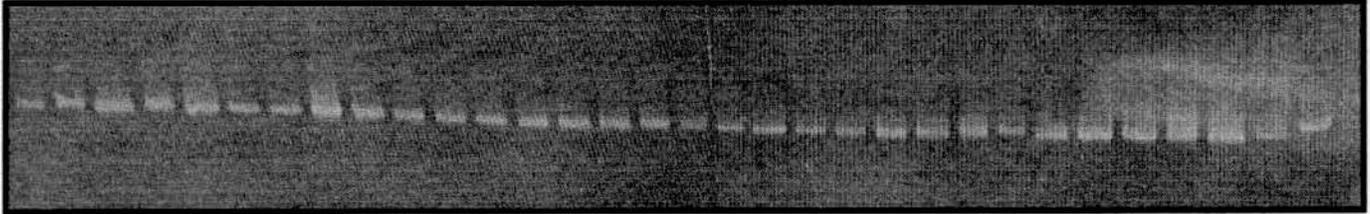


Figura 11: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 10S/2. As setas indicam as alterações de migração.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32



33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64

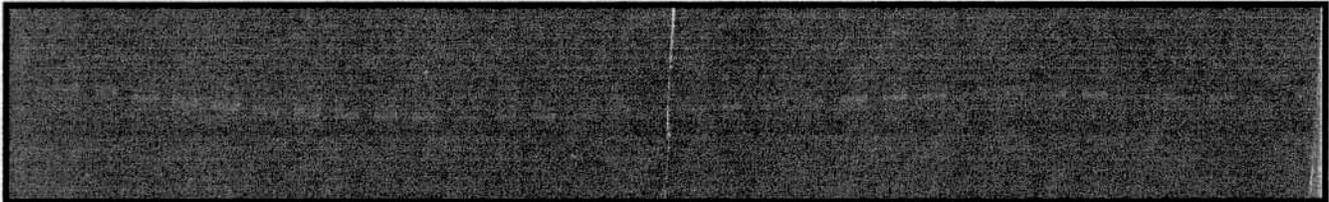


65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96

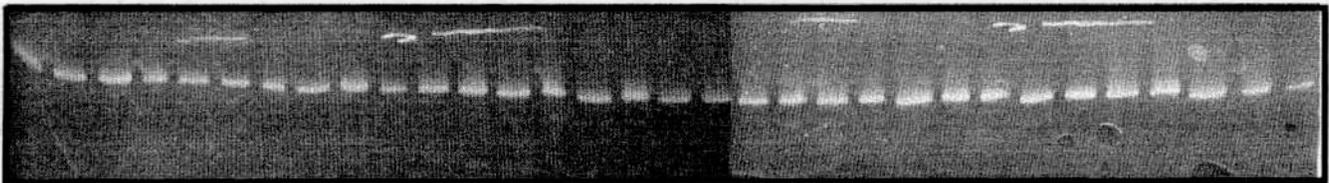


Figura 12: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 1C/2C. A seta indica a alteração de migração.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32



33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64



65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96

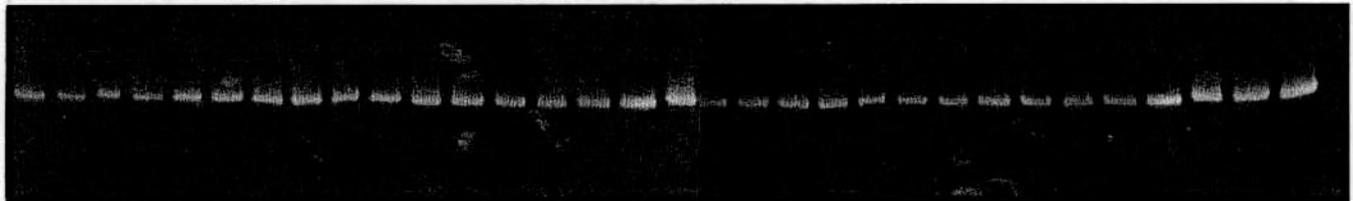


Figura 13: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 3C/4C. A seta indica a alteração de migração.

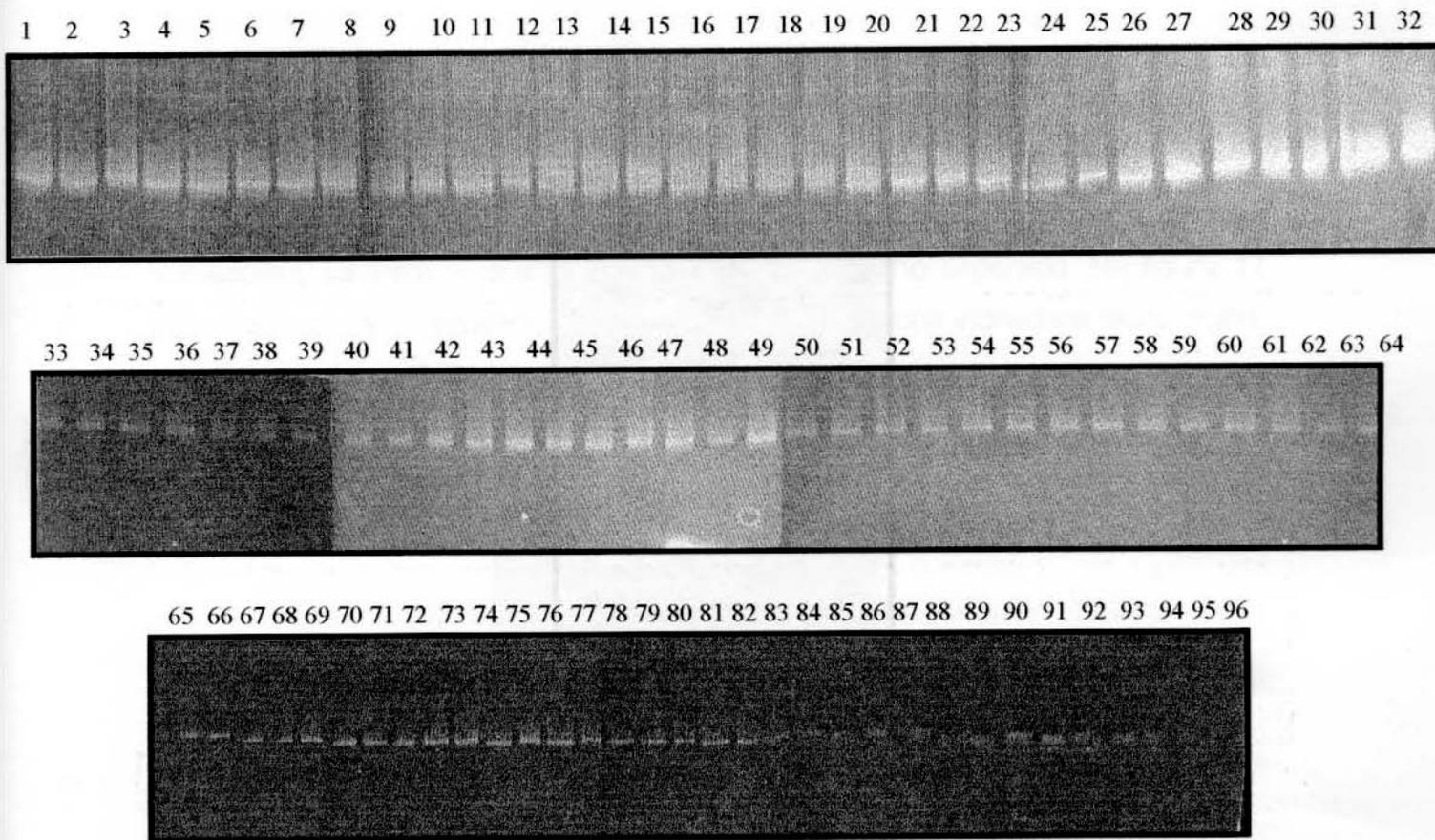


Figura 14: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 776/1245.

Somente uma mutação foi confirmada, uma deleção de T na posição +36 , à jusante dos sítios de transcrição TIS I (+1) e II (+12), sendo a única alteração de migração detectada por CSGE nos fragmentos gerados pelo par de iniciadores 3C/4C, representado em detalhes na figura 15. O resultado do seqüenciamento manual, evidenciando a deleção da base T, pode ser visualizado na figura 16.

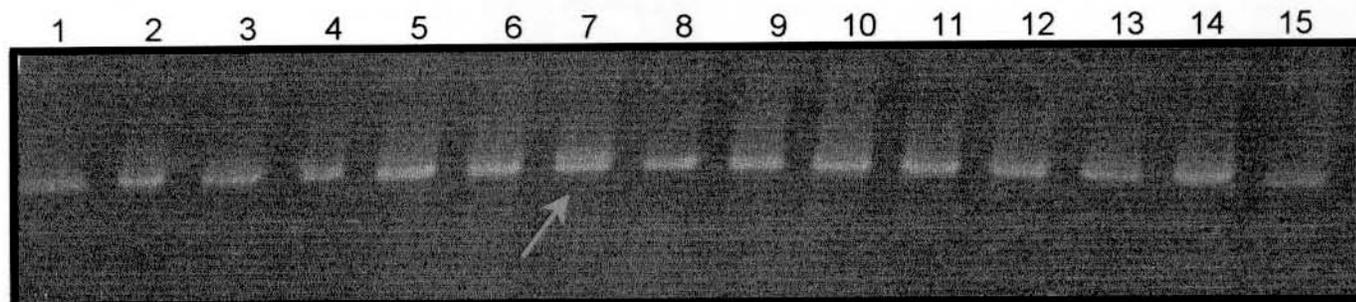


Figura 15: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 3C/4C. A seta indica a alteração de migração.

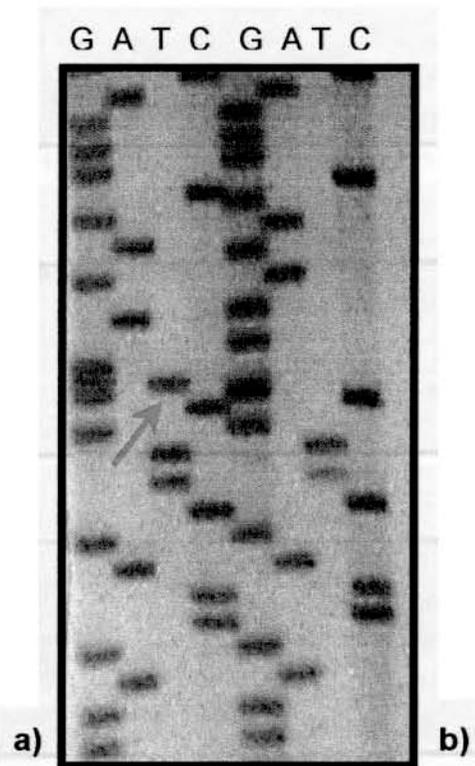


Figura 16: Seqüenciamento do fragmento distal com o iniciador 3C. a) indivíduo normal; b) indivíduo apresentando deleção detectada na posição +36. A seta evidencia a base T na posição + 36, presente no indivíduo usado como controle.

2) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em pacientes com CaP

Os 100 DNAs de pacientes com CaP, amplificados com os quatro pares de iniciadores, também revelaram fragmentos de tamanho esperado. Na figura 17 acha-se ilustrado o resultado da reação de PCR de alguns indivíduos deste grupo, com os iniciadores 3C/4C.

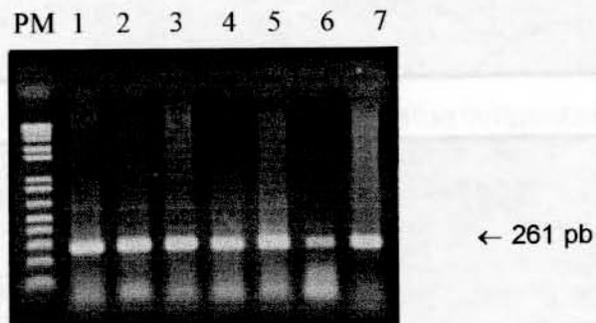


Figura 17: Fragmentos gerados por amplificação pela PCR com os iniciadores 3C/4C (PM = peso molecular de 1 kb – Gibco BRL).

Os fragmentos foram submetidos inicialmente à técnica de SSCP para a detecção de possíveis alterações moleculares, porém nenhuma alteração de migração foi verificada. Neste caso utilizou-se o produto da PCR do indivíduo que apresentou a deleção –T como controle positivo de alteração de migração. A figura 18 ilustra o resultado da análise de SSCP dos produtos de PCR gerados com o par de iniciadores 3C/4C, de alguns indivíduos deste grupo.

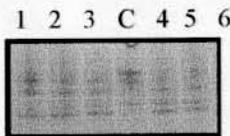


Figura 18: SSCP dos produtos da PCR, gerados com os iniciadores 3C/4C, de alguns pacientes com CaP, sem alteração de migração. C = controle (doador com a deleção de T na posição +36).

O rastreamento por CSGE foi realizado para os produtos de PCR correspondente aos pares de iniciadores 10S/2 e 3C/4C. Em ambas as situações (figuras 19 e 20), nenhuma alteração de migração foi detectada.

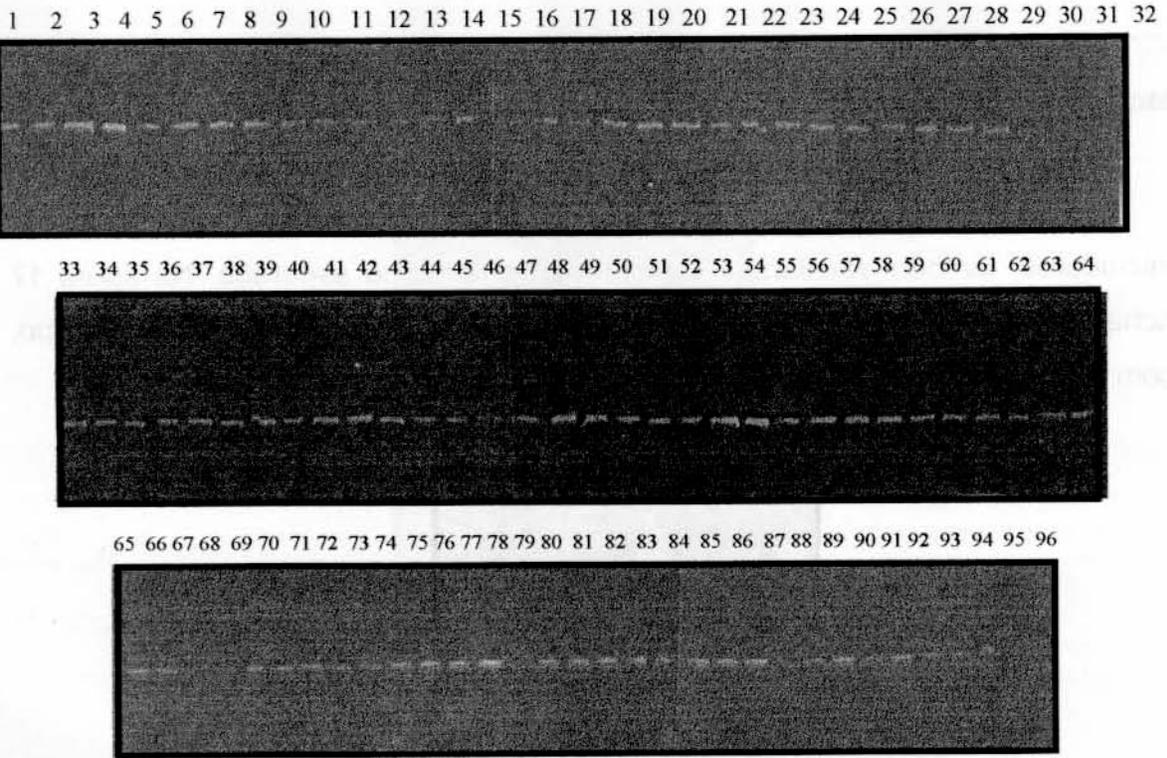


Figura 19: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 3C/4C.

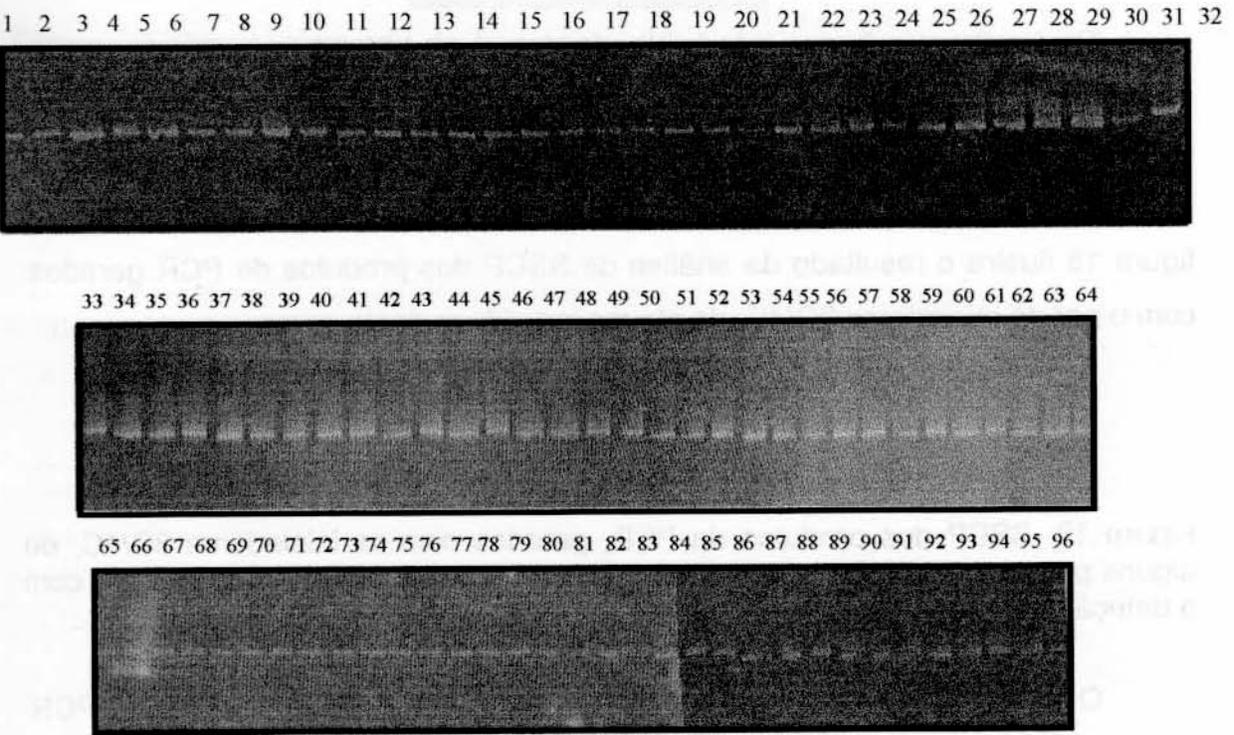


Figura 20: CSGE dos produtos da PCR gerados pelos iniciadores 10S/2.

3) Análise da Região Promotora do Gene do Receptor de Andrógenos em Vertebrados

Os clones obtidos a partir da ligação dos produtos de amplificação pela PCR dos vertebrados analisados (figura 21) foram seqüenciados, e as seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – ALTSCHUL *et al.*, 1990). Porém apenas os produtos de amplificação obtidos com o par de iniciadores 3C/4C revelaram um bom grau de similaridade (em torno de 80%) com a região promotora do gene *RA* humano, como mostrado no Anexo I.

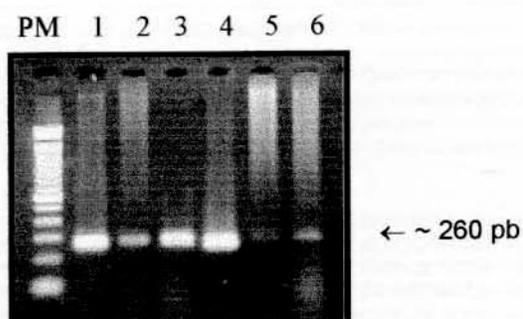


Figura 21: Produto de amplificação utilizando-se o par de iniciadores 3C/4C e, como molde o DNA genômico de: 1 – gato, 2 – boi, 3 – cavalo, 4 – macaco, 5 – galinha, 6 – peixe (PM = peso molecular de 100 pb – Gibco BRL).

Já os produtos de amplificação da PCR obtidos por intermédio do par de iniciadores 10S/2, quando submetidos ao alinhamento por BLAST, não revelaram nenhuma similaridade de seqüência com a região promotora do gene *RA* humano, ou de outros receptores esteroidais.

galinha	CGAGCTAGCAGC--TCCAGTGTGGGACAGGAGCTGAAGGGACATACCGCGTCAACCCC-A	232
gato	CGAGCTAGCAGC--TCCAGTGTGGGACAGGAGCTGAAGGGACATACCGCGTCAACCCC-A	276
boi	CGAGCTAGCTGT--TCCCGTGC GGGACAGGGCCCTAAGGGACGCACCGCGTCAACCCC-A	215
egua	-----CCGC--TTCAGTGC GGGACAGGAGCCGAAGGGAGCCACCGCGTCAACCCC-A	246
macaco	CGAGCTAGCAGN--TNCAGTGTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCACGCCAGCCNCA	218
epta	CTAGCTAGCCGT--TCNAGTGNTGTACAGGAGCNGAANGGACGCACCACGCC-----	280
rato	TGAGCTAGCCACCCCTCCAGTGCCATACAGAAGCTT-----	247
camundongo	TGAGCTAGCCAC-----	218
humano	CGAGCTAGCCGC--TCCAGTGTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCACGCCAGCCCC-A	292

*

Figura 22: Alinhamento, por CLUSTAL W, das seqüências da região promotora do gene RA de vertebrados, amplificadas por PCR a partir de iniciadores humanos. Os asteriscos abaixo das seqüências alinhadas indicam que nesta posição a base nucleotídica é idêntica em todas as amostras analisadas. As bases marcadas em amarelo correspondem ao sítio de ligação à proteína Sp1, em verde ao TIS II, em azul ao TIS I e em magenta à base ausente detectada por CSGE em um dos indivíduos doadores de sangue.

4) Isolamento do gene do Receptor de Andr6genos (RA) e sua regi3o promotora em *Eptatretus sp.*

a) Northern blot

Uma vez que n3o se obteve resultados com a sonda de 1,5Kb, a membrana de Northern blot foi hibridizada com a sonda de 350 pb, obtida a partir de PCR, tendo-se como molde cDNA de test3culo de camundongo. Na figura 23 acha-se reproduzido o resultado da auto-radiografia referente a este experimento. Uma banda de fraca intensidade foi detectada, na canaleta correspondente ao RNA de tecido do oviduto. Algumas outras bandas, tamb3m de fraca intensidade foram detectadas).

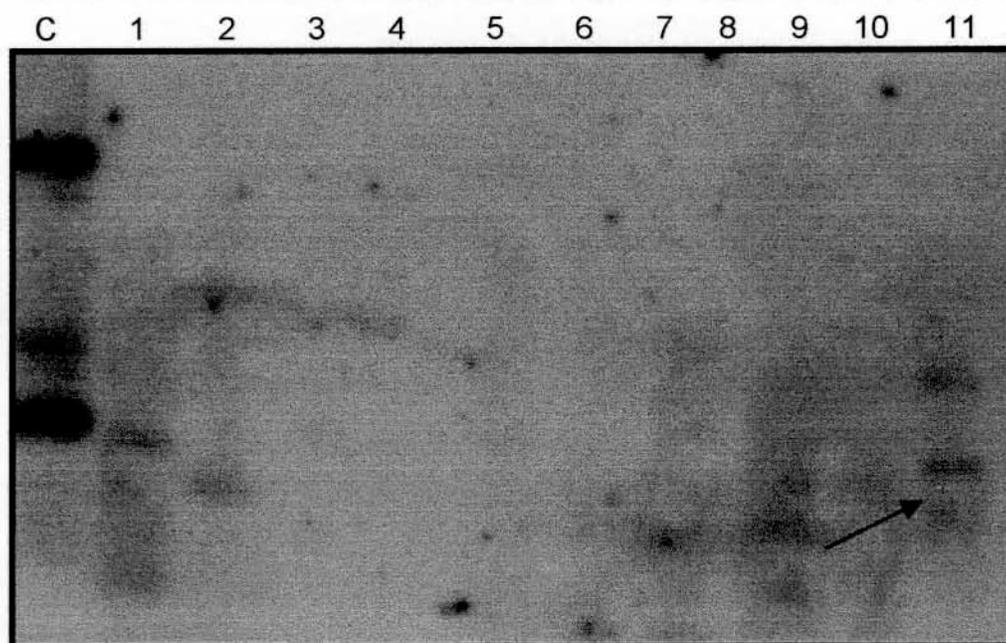


Figura 23: Autoradiografia da hibridiza33o da sonda de 350pb (obtida pela amplifica33o de cDNA de test3culo de camundongo com os iniciadores aAR) com a membrana de Northern blot. A seta indica a banda correspondente 33o hibridiza33o da sonda com o tecido de oviduto. C = RNA controle de test3culo de camundongo. 1 – c3erebro, 2 – cora33o, 3, 4, 5 e 6 – f3gado (em concentra33es crescentes de 1, 3 e 5 μ g), 7 – m3sculo, 8 e 9 – ovos, 10 e 11 – oviduto.

c) Race

As seqüências geradas por RACE (tanto com o kit da Gibco BRL, quanto com o da Clontech) foram submetidas ao BLAST. Porém, nenhuma destas seqüências revelou similaridade com o gene RA ou algum outro receptor esteroideal.

d) Construção de Biblioteca Genômica em cosmídeo Lawrist 4

Várias tentativas foram feitas para a construção da biblioteca genômica de *Eptatretus sp.* em Lawrist 4, porém não se conseguiu ligar o DNA do peixe, digerido com a enzima de restrição *Mbo* I, ao vetor. Deve-se ressaltar que foi feito um controle de ligação, o qual revelou resultados positivos.

e) Southern blot

Na figura 25 encontra-se representada a auto-radiografia referente ao experimento de Southern blot, onde detectou-se bandas correspondentes à hibridização da porção conservada da sonda rsAR com o DNA de *Eptatretus sp.* digerido com diferentes enzimas de restrição (indicadas por setas).

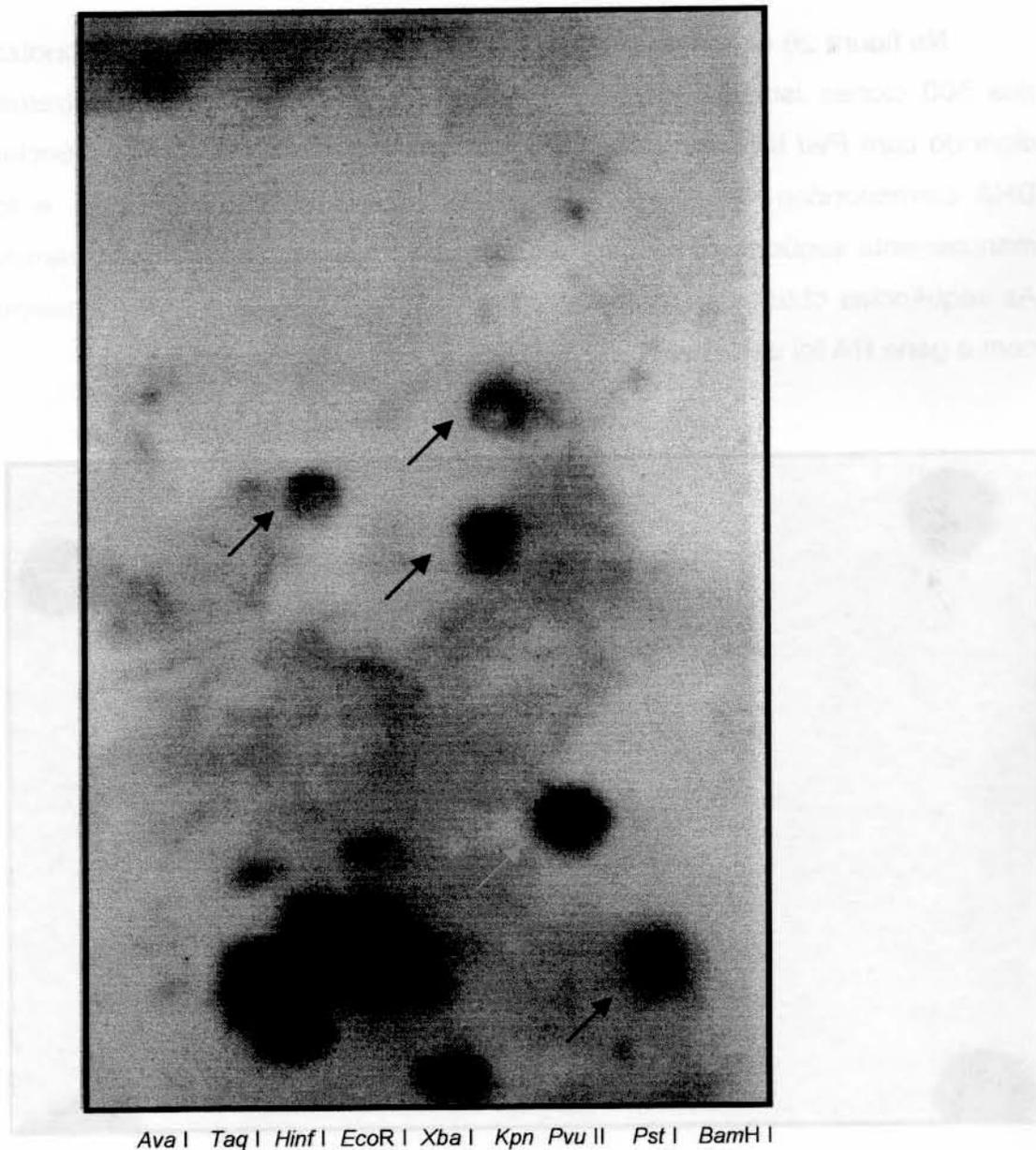


Figura 25: Auto-radiografia da hibridização da membrana de Southern blot contendo as amostras de DNA de *Eptatretus* sp., digeridas com 9 enzimas de restrição diferentes (*Ava* I, *Taq* I, *Hinf* I, *EcoR* I, *Xba* I, *Kpn* I, *Pvu* II, *Pst* I, e *BamH* I), com a sonda GSP sense/rsAR antisense. A seta vermelha corresponde à banda escolhida para a construção do mini-banco (*Pvu* II).

f) Macroarray do mini banco construído com DNA digerido com *Pvu* II

Na figura 26 encontra-se representado o resultado referente à hibridização dos 500 clones isolados do mini banco de DNA genômico de *Eptatretus* sp. digerido com *Pvu* II (macroarray). Os clones passíveis de conter seqüências de DNA correspondem aos pontos com maior intensidade de marcação, e foram manualmente seqüenciados com o kit Thermosequenase (Amersham Pharmacia). As seqüências obtidas foram submetidas ao Blast, porém nenhuma similaridade com o gene RA foi detectada.

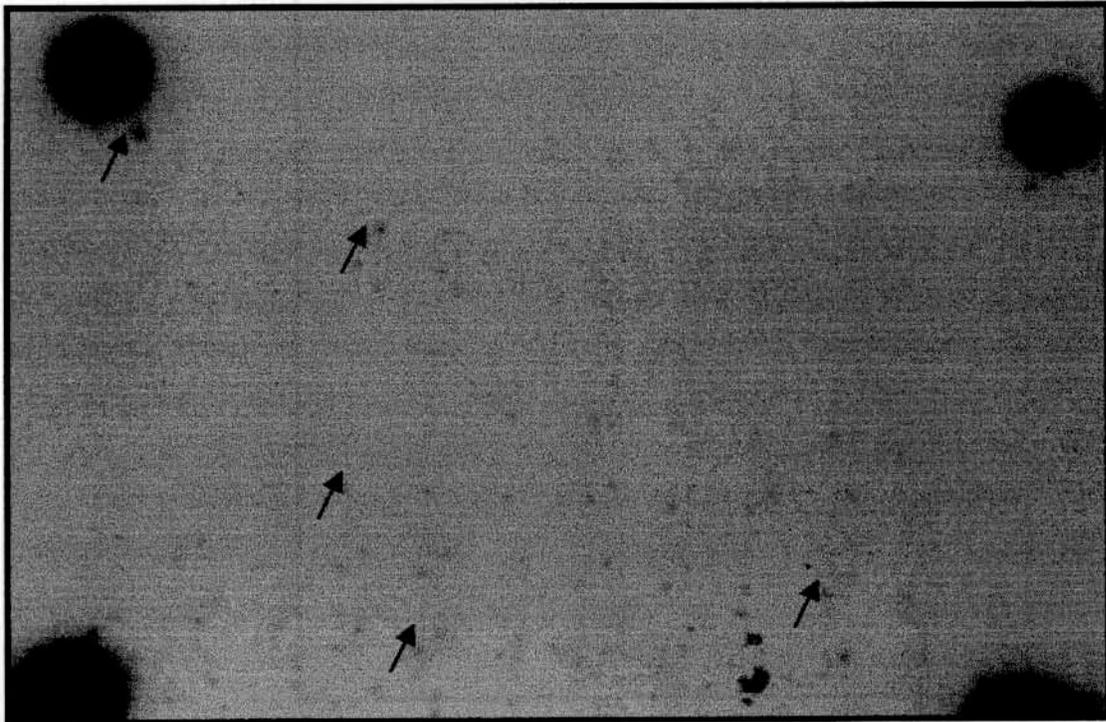


Figura 26: Auto-radiografia da hibridização da membrana de macroarray com a sonda resultante da amplificação do par de iniciadores GSP sense/rsAR anti-sense, utilizando-se como molde o clone da sonda rsAR. Os borrões em cada uma das extremidades da membrana são devido ao excesso de sonda aplicada, a qual foi colocada nestes pontos com o intuito de se ter um controle positivo de hibridização. Foram aplicados, tal qual cada amostra, 100 ng de sonda, quando, na verdade, apenas 5 ng seriam mais do que necessários. As setas indicam alguns dos clones que apresentaram sinal de hibridização e foram seqüenciados.

Discussão

DISCUSSÃO

A) REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM HUMANOS

O receptor de andrógenos, necessário para o desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias, pertence ao subgrupo de receptores esteroidogênicos, com domínios funcionais característicos e bem determinados. Além do domínio de ligação ao DNA e aos hormônios, o gene RA possui uma região NH₂ terminal necessária para a ativação transcricional, a qual é claramente a mais divergente, em termos de seqüência, de outros receptores (CHOONG *et al.*, 1998).

Na região NH₂ terminal do gene RA, há várias seqüências repetidas de trinucleotídeos, cujas funções são pouco conhecidas. A repetição de glutamina, a qual se inicia no códon 58 do gene RA humano é altamente polimórfica, com uma média de repetição de 22~2 resíduos na população (EDWARDS *et al.*, 1992). A expansão desta repetição é associada com a doença de Kennedy (LA SPADA *et al.*, 1991), enquanto que as diminuições destas repetições estão relacionadas a um maior risco de CaP agressivo (CHOONG *et al.*, 1998).

A ação dos andrógenos no desenvolvimento e crescimento de carcinomas prostáticos é bem documentada. O RA facilita a regulação de genes andrógenos-induzida, envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Desde o início da década de 40 a ablação de andrógenos vem sendo a base do tratamento para o câncer de próstata metastático. Apesar de sua alta eficiência inicial, a terapia hormonal não é curativa, e a resistência tumoral tende a prevalecer (CUDE *et al.*, 1999).

Mutações as quais alterem a conformação, função e/ou regulação do RA podem promover uma vantagem seletiva de crescimento para subpopulações celulares tumorais que sejam capazes de proliferação em um meio com deprivação androgênica. Clinicamente tais mutações são de grande importância, uma vez que estas podem levar ao crescimento de tumores andrógeno-independentes, progredindo a um estado refratário (CUDE *et al.*, 1999).

Mutações somáticas em regiões codificantes, as quais são de fato a maioria das alterações detectadas em pacientes com CaP, estão distribuídas ao longo de todo o gene RA (<http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>). São conhecidas 61 alterações moleculares, das quais apenas 4 são de linhagem germinativa (Tabela 5). Encontra-se uma maior concentração de diferentes trocas nucleotídicas no éxon 5, o qual corresponde à região de ligação ao hormônio. Entre estas, uma mutação germinativa representada por uma transversão de G para T no aminoácido 726 (R726L) pode corresponder a 2% das alterações detectadas em pacientes finlandeses com CaP (MONONEN *et al.*, 2000). A casuística analisada por estes autores constou de 418 pacientes com CaP esporádico e 106 pacientes com recorrência familiar.

Dentre as outras mutações detectadas em linhagem germinativa, uma delas ocorre no éxon 6, levando à substituição de aminoácido na posição 798 (Q798E). Esta mutação, encontrada por EVANS *et al.* (1996) em DNA genômico de um paciente com CaP, já foi descrita em dois pacientes com insensibilidade parcial aos andrógenos (QUIGLEY *et al.*, 1995 ; BEVAN *et al.*, 1996) e em dois pacientes com azoospermia (WANG *et al.*, 1998 ; HIORT *et al.*, 2000).

Tabela 5: Mutações descritas no gene do receptor de andrógenos em pacientes com CaP (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

Tipo de Alteração	Número de ocorrências	
	Somático	Germinativo
Defeitos Estruturais		
Deleção gênica parcial	1	
Deleções de 1 a 4 pb	5	
Inserções	1	
Mutações de Ponto		
Códon de terminação precoce	4	
Substituição de aminoácido	38	2
Substituição dupla de aminoácido	6	
Substituições múltiplas de aminoácido	1	
Região 5' UTR		2
Região 3' UTR	1	

As outras duas mutações germinativas estão localizadas na região 5' UTR e foram detectadas por CROCITTO *et al.* (1997). Estes autores analisaram amostras de DNA de 38 pacientes com câncer de próstata e de 32 indivíduos sadios, por meio de SSCP radiativo. Tais alterações moleculares, situadas na porção distal do promotor do gene RA, podem estar envolvidas em um possível papel do promotor do gene RA na predisposição ao CaP, bem como na expressão gênica. A primeira delas, uma substituição G2T, acha-se localizada no sítio de transcrição TIS II, e foi detectada em um paciente de 65 anos de idade sem história familiar de CaP. A segunda, uma transversoão C214A, situada numa região rica em GC, foi detectada em um paciente de 76 anos, com pai e irmão afetados por CaP. Esses autores consideram que, embora raras, mutações na região 5' UTR do gene RA poderiam contribuir para a manifestação do câncer de próstata, alterando a taxa de transcrição e/ou de tradução do gene.

Como visto, somente uma mutação foi detectada no presente trabalho, tratando-se de uma deleção de uma base T localizada 36 bases à jusante do sítio TIS II (figura 27). Esta deleção situa-se entre as mutações descritas por CROCITTO *et al.* (1997), e foi encontrada em um indivíduo do grupo de doadores de sangue, referido como sadio e pai de três filhos, com cerca de 45 anos de idade. Nessa situação, torna-se difícil avaliar o significado dessa deleção na região promotora, uma vez que por estar localizada entre as seqüências mais importantes da região regulatória (sítios TIS e regiões ricas em GC), pode tanto comprometer fortemente a função do gene *RA* a longo prazo como ser inócua.

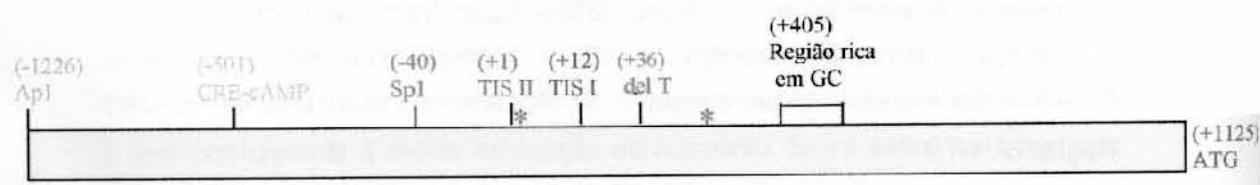


Figura 27: Região promotora do gene *RA*. Destaca-se nesta figura a alteração molecular detectada, especialmente localizada em relação aos sítios de início de transcrição (TIS I e II) e ao sítio para Sp1 (numeração segundo TILLEY *et al.*, 1990). Os asteriscos indicam a posição aproximada das mutações detectadas por CROCITTO *et al.*, 1997.

No presente estudo, onde dentre 100 indivíduos doadores cujo promotor foi analisado apenas uma alteração foi detectada, pode-se considerar que tal região seja realmente homogênea, em decorrência de pressões seletivas que foram vitais para que esse gene viesse a exercer um papel fundamental no controle da diferenciação sexual masculina. Ao mesmo tempo, a ausência de variação detectável da região conservada dos 100 pacientes com CaP reforça a idéia de homogeneidade dessa região, e indica que é pouco provável o seu envolvimento na etiologia do câncer de próstata.

Postula-se que a presença de polimorfismos na região promotora de genes possa estar envolvida com a regulação da expressão dos mesmos. De fato esperava-se encontrar na região proximal, a qual não possui nenhum sítio necessário ao processo transcricional, em humanos, mais alterações do que foi detectado, em função de uma menor pressão seletiva.

B) REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM VERTEBRADOS

O alinhamento das seqüências da porção distal da região promotora do gene *RA* em vertebrados revelou um alto grau de similaridade entre as mesmas, com a conservação integral da seqüência correspondente aos sítios de início de transcrição (TIS) I e II, e uma grande similaridade da seqüência de seis nucleotídeos, referentes ao sítio de ligação à proteína Sp1. Não podemos esquecer que a seqüência consenso do sítio de ligação à proteína Sp1 é variável, podendo ser composto de 6 a 10 nucleotídeos: KGGCGKRRY, onde K=G ou T, R= A ou G, e Y= C ou T (LOCKER, 1996). Se considerarmos a seqüência humana como base para comparação, dos seis nucleotídeos que compõe o sítio de ligação à Sp1, dois apresentam variação, consistindo de transições de G→C. O nucleotídeo T na posição +36, o qual encontra-se ausente em um dos cem indivíduos doadores de sangue, também mostrou-se extremamente conservado nas espécies de vertebrados analisadas, diferindo em apenas duas delas (no caso, o gato e a galinha), como pode ser observado na figura 7 dos resultados.

Esta região, correspondente aos sítios de TIS I e II, e de ligação à proteína Sp1, é a mais conservada entre os vertebrados analisados, e foi amplificada utilizando-se os iniciadores humanos 3C/4C. A outra região do promotor que foi amplificada revelou grande inespecificidade de seus produtos, e após ligação ao vetor para seu seqüenciamento, este mostrou a não-similaridade das seqüências obtidas com a região promotora do gene *RA* humano.

De fato isso era esperado, uma vez que, no caso da região promotora do gene *RA* humano, os elementos responsáveis pela transcrição, como o sítio de ligação da proteína Sp1, os sítios de início de transcrição (TIS) I e II, e outros elementos como CRE-cAMP responsivo e o sítio Ap1 encontram-se localizados na porção distal do promotor (FABER *et al.*, 1993). De fato, a discussão grau de conservação de região distal/proximal do promotor torna-se importante quando

localizamos espacialmente os elementos necessários ao processo transcricional.

No caso da região promotora do gene *RA* em humanos sabe-se que é na região distal, em relação ao códon de início da tradução ATG, onde se encontram os sítios de ligação à proteína Sp1 e de TIS, sendo esta a que sofre conservação seletiva. Em outros genes e/ou outros organismos esta região pode sofrer variações, sendo, por exemplo, a proximal ao ATG, a mais conservada. De qualquer forma, o grau de conservação dessas regiões estará intimamente relacionado com a presença de sítios envolvidos com o processo transcricional.

Analisando-se as seqüências da região promotora do gene *RA* em vertebrados, pode-se dizer que provavelmente os elementos promotores mínimos TATA e CCAAT não desapareceram ao longo de milhões de anos, não tendo sido necessários para que houvesse a transcrição do gene. Tal fato corrobora a hipótese de que a região promotora do gene *RA* não perdeu nenhuma seqüência essencial à sua atividade, mantendo-se extremamente conservada ao longo do processo evolutivo. Estudos de evolução molecular em vertebrados têm demonstrado que as seqüências nucleotídicas de regiões promotoras podem sofrer uma conservação seletiva (SHAIN *et al.*, 1998).

Um exemplo é o promotor do gene da E-proteína (ME1), um fator transcricional “helix-loop-helix” associado com o desenvolvimento morfológico. A expressão deste gene é regulada por um promotor, o qual, assim como o gene *RA*, não possui o elemento promotor mínimo TATA, e sim vários sítios de ligação para a proteína Sp1, “E-boxes”, e sítios de início de transcrição. As regiões que contêm esses sítios são extremamente conservadas (mais de 80% de similaridade) em anfíbios, camundongos e humanos (SHAIN *et al.*, 1998). Assim, pode-se pressupor que uma forte pressão evolutiva atuou tanto nas seqüências regulatória como na codificante desse gene.

Um contraponto interessante aos promotores dos genes RA e ME1 é fornecido pela região promotora do gene do hormônio de crescimento. Este possui como elemento promotor mínimo a seqüência TATA, além de outros sítios de ligação de fatores transcricionais. Apesar do elemento TATA ser extremamente conservado, tanto em posição como em seqüência em doze mamíferos estudados, ao menos oito nucleotídeos são polimórficos em humanos. A região promotora deste gene também evoluiu de forma distinta, com taxas diferentes para os vários períodos da escala evolutiva, ou seja, não uniformemente tanto em termos temporais quanto espaciais (KRAWCZAK *et al.*, 1999).

Se considerarmos o grau de conservação de seqüência e a variabilidade de cada gene, podemos dizer que genes essenciais admitiriam menos polimorfismos do que genes não essenciais, dado a extrema pressão seletiva a que estão submetidos. São poucos os estudos sobre a região promotora de genes da superfamília de receptores nucleares, quando comparado aos inúmeros estudos sobre estrutura-função. A família de receptores nucleares surgiu muito cedo na história evolutiva do reino animal, mas incrivelmente os membros da superfamília esteroidogênica, como o gene RA, são interessantes exceções, uma vez que são conhecidos apenas em vertebrados (GRONEMEYER & LAUDET, 1995).

A estrutura da região promotora em toda a superfamília gênica parece estar conservada em várias espécies distintas. Tal conservação pode ser um forte indicativo de sua importância funcional. Apesar da presença dos sítios para a proteína Sp1 e TIS I e II terem sido observadas na região promotora de todos os vertebrados analisados no presente estudo, o mais curioso é de fato não se ter encontrado um número maior de alterações entre humanos. A alta conservação de seqüência e de posição dos TIS I e II entre os vertebrados é extremamente significativa principalmente a co-incidência dos sítios TIS. Juntos, tais resultados sugerem que estes possam funcionar como uma unidade de início de transcrição em um organismo ancestral que precedeu os vertebrados.

Em promotores onde há ausência do elemento mínimo TATA, a interação entre TIS, proteínas Sp1 e outros fatores transcrpcionais podem causar súbitas variações na expressão, contrastando com “enhancers” ou outros elementos da região promotora responsáveis por padrões de expressão tecido-específicos, os quais são importantes na determinação de quando e onde um gene será expresso. A variação nesses elementos controladores temporais e espaciais pode resultar na interrupção da função. Variações na seqüência da região promotora podem ter como efeitos diretos apenas sutis mudanças nos processos transcrpcionais, mas essas pequenas mudanças podem desencadear variações bruscas que afetem drasticamente a expressão gênica (CRAWFORD *et al.*, 1999).

Análises evolutivas, em conjunto com a análise molecular experimental, podem ser extremamente úteis para se determinar se variações nos sítios de ligação proteína/DNA são biologicamente importantes. Muitos estudos vêm demonstrando como diferentes componentes da região promotora interagem e afetam os processos transcrpcionais, mas estes estudos não levam em conta possíveis (e plausíveis) efeitos de “enhancers” distantes ou mesmo da estrutura da cromatina.

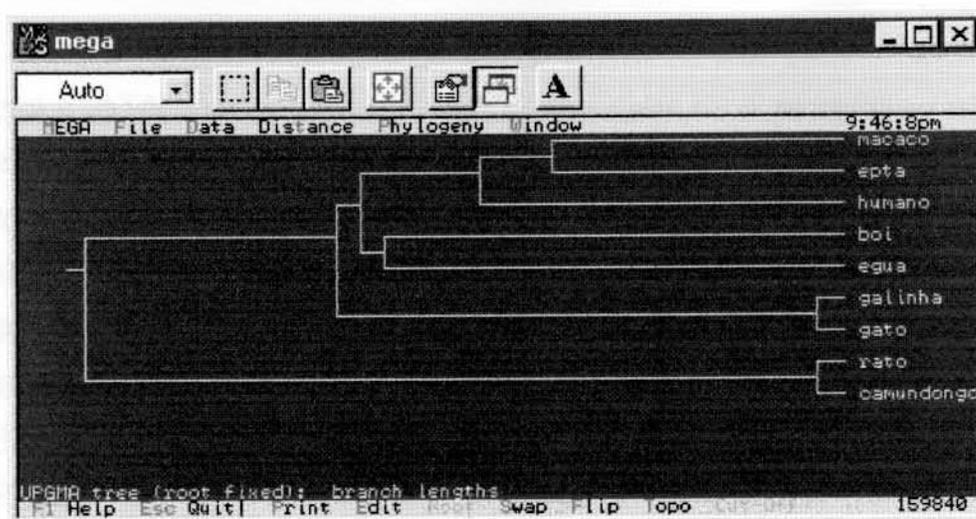


Figura 28: Filogenia obtida a partir das seqüências da região promotora do gene *RA* de vertebrados. Para tal, utilizou-se o programa MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (KUMAR, TAMURA & NEI, 1994), com a distância *p*, o método de construção de árvore UPGMA.

As seqüências da região promotora do gene *RA* em vertebrados indicam que os elementos – TIS I e II, e sítio de ligação á proteína Sp1 - sempre foram os responsáveis, durante o processo evolutivo, por desencadear e controlar a transcrição gênica, uma vez que estão altamente conservados em todas as seqüências analisadas. No entanto, árvore filogenética gerada a partir dessas seqüências não é capaz de ordenar evolutivamente as espécies estudadas (figura 28). De fato, apesar de altamente similares, estamos trabalhando com seqüências curtas e não codificantes, que não permitiram gerar árvores robustas e confiáveis. Neste caso seria de grande valor e importância que dispuséssemos da região codificante do gene *RA* de todas as espécies estudadas para que fosse válida e confiável a análise filogenética.

C) ISOLAMENTO DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E SUA REGIÃO PROMOTORA EM *EPTATRETUS SP.*

Por se tratarem de genomas extremamente instáveis, provavelmente devido à presença de transposons, a clonagem de DNA genômico de peixes não é considerada trivial (TRICHET *et al.*, 2000). Em adição à instabilidade genômica, outros elementos indicam que a tentativa de isolamento do gene RA nesses espécimes de *Eptatretus sp.* possa não ser viável, sendo discutidos a seguir.

Desta forma, parte dos problemas com a clonagem do gene pode estar relacionada por pouco se conhecer a fisiologia reprodutiva desses animais, sendo esses estudos limitados a três espécimes: *Myxine glutinosa* (costa norte do Atlântico), *Eptatretus stouti* (costa leste do Pacífico) e *Eptatretus burgeri* (costa oeste do Pacífico), havendo um excesso de fêmeas e a definição sexual ocorrendo em espécimes com mais de 20 cm de comprimento (GORBMAN, 1990).

De fato, os dois espécimes capturados na nova coleta eram fêmeas, com comprimento superior a 30 cm. Apesar de ambos serem fêmeas e isso já representar uma grande desvantagem, frente à chance de expressão do gene RA, sempre haveria a possibilidade de que o mesmo fosse transcrito, quer no fígado, quer no ovário/oviduto, mesmo que em pequena quantidade. Com efeito, em estudo realizado em uma espécie unissexual de lagarto (*Cnemidophorus uniparens*), a expressão do gene RA foi detectada em ovidutos e rins (YOUNG *et al.*, 1995).

Entretanto, ao que tudo indica, este gene pode estar sub-representado, mesmo no DNA genômico, ou ter sofrido rearranjos, pela possibilidade de instabilidade genômica mediada por retrotransposons. Além disso, a variabilidade do tamanho do genoma estimada para a classe Agnata (de 637 Mb a 2,7 Gb, LI, 1997), torna muito mais difícil a construção de uma biblioteca genômica representativa.

Curiosamente, esses peixes primitivos também exibem um fenômeno inicialmente reconhecido apenas em alguns invertebrados: a eliminação cromossômica. Assim, por exemplo, em *Eptatretus burgeri*, observou-se um número diplóide de 48 cromossomos nas espermatogônias, mas apenas 36 cromossomos são observados nas brânquias e em outros tecidos (KOHNO *et al.*, 1998). As percentagens de decréscimo de DNA em células somáticas de oito espécies de mixinídeos analisadas variaram entre 20 e 74%. As evidências citogenéticas indicam que os cromossomos eliminados nos tecidos são Banda C positivos, isto é, ricos em heterocromatina, de modo que haveria um predomínio na eliminação de DNA altamente repetido. No entanto, em algumas espécies também ocorre a eliminação de cromossomos ricos em eucromatina. (KOHNO *et al.*, 1998)

O fato de ter sido obtida a amplificação de uma região promotora de *Eptatretus sp* com uso de iniciadores humanos para região promotora do gene RA, foi surpreendente. Por outro lado, por se tratar de uma região relacionada ao controle da expressão gênica, é de se supor que esta possa ter sido mais conservada ao longo do processo evolutivo.

Frente a todos os aspectos levantados, não se pode afirmar categoricamente que a região promotora clonada por PCR em *Eptatretus sp* seja de fato a região promotora do gene RA, não se descartando a hipótese de se tratar da região promotora de algum receptor órfão, membro da superfamília de receptores nucleares.

Em princípio, o mesmo poderia ser dito em relação às seqüências correspondentes às regiões promotoras amplificadas das outras espécies analisadas no presente trabalho. Entretanto, nessas outras espécies estudadas, o processo de diferenciação sexual é bem estabelecido, havendo nítidas distinções entre machos e fêmeas, dependentes de interações entre hormônios sexuais e

seus receptores.

Na classe Agnatha, existem indicações da produção de esteróides sexuais pelas gônadas, todavia em quantidades muito inferiores às observadas na maioria dos vertebrados (revisão em PATZNER, 1998). Isto pode significar que os processos de diferenciação gonadal e sexual não sejam hormônio-dependentes e que a presença de receptores órfãos nesses animais tenha diferente significado funcional.

Como as “feiticeiras” são os vertebrados mais primitivos, estudos da sua reprodução tornam-se essenciais para a compreensão de aspectos filogenéticos da reprodução em todos os vertebrados. Assim, todos os pontos acima levantados, ao mesmo tempo em que fundamentam as possíveis causas do insucesso quanto ao objetivo de se isolar o gene RA e sua promotora em *Eptatetrus sp.*, também revelam um modelo biológico fascinante, que merece ser objeto de maiores investigações citogenéticas, fisiológicas e moleculares.

Conclusões

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos a partir deste trabalho nos levam às seguintes conclusões:

- A região promotora do gene RA mostrou-se extremamente conservada entre humanos, sendo apenas uma alteração (uma deleção) detectada.
- Em vertebrados, a análise mostrou um alto grau de similaridade na região onde há os sítios de ligação (TIS) I e II e o sítio de ligação à proteína Sp1, o que indica a evolução conservativa desta região.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS EW, LIPMAN DJ. - Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** **215(3)**: 403-410, 1990.
- ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA JR., G.; FARAH, S.B.; DE MELLO, M.P. - Molecular Analysis of CYP21 and C4 Genes in Brazilian Families the Classical Congenital Adrenal Hyperplasia. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **29**: 1-13, 1996.
- BAARENDS, W.M.; THEMEN, A.P.N.; BLOK, L.J.; MACKENBACH, P.; BRINKMANN, A.O; MEIJER, D.; FABER, P.W.; TRAPMAN, J.; AND GROOTEGOED, J.A. - The rat androgen receptor gene promoter. **Mol. Cell. Endocrinol.** **74**: 75-84, 1990.
- BAKER, M.E. - Steroid receptor phylogeny and vertebrate origins. **Mol. Cell. Endocrinol.** **135**: 101-107, 1997.
- BEVAN, C.L.; BROWN, B.B.; DAVIES, H.R.; EVANS, B.A.J.; HUGHES, I.A.; AND PATTERSON, M.N. - Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, **5(2)**:265-273, 1996.
- CHOONG, C.S.; KEMPPAINEN, J.A.; AND WILSON, E.M. - Evolution of the primate androgen receptor: a structural basis for disease. **J. Mol. Evol.** **47**: 334-342, 1998.
- COOPER, D.N. - Human Gene Evolution. Bios Scientific Publishers, 490pp, 1999.
- CRAWFORD, D.L.; SEGAL, J.A; AND BARNETT, J.L. - Evolutionary analysis os the TATA-less proximal promoter function. **Mol. Biol. Evol.** **16(2)**: 194-207, 1999.
- CROCITTO, L.E.; HENDERSON, B.E.; AND COETZEE, G.A. - Identification of two germline point mutations in the 5' UTR of the androgen receptor gene in men with prostate cancer. **J. Urol.** **158**: 1599-1601, 1997.
- CUDE, K.J.; DIXON, S.C.; GUO, Y.; LISELLA, J. AND FIGG, W.D. - The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. **J. Mol. Med.** **77**: 419-426, 1999.

- DE JONG, P.J.; CHEN, C. AND GANES, J. In Erlich, H; Gibbs, R.A. and Kazazian, H.H. - Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor. Application of PCR for the construction of vectors and the isolation of probes. Pp 205-210, 1989.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, T.; AND CHAKRABORTY, R. - Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, **12**: 241-153, 1992.
- EVANS, B.A.; HARPER, M.E.; DANIELLS, C.E.; WATTS, C.E.; MATENHELIA, S.; GREEN, J. AND GRIFFITHS, K. - Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. **Prostate** **28(3)**: 162-171, 1996.
- ESCRIVA, H., SAFI, R., HÄNNI, C., LANGLOIS, M-C., SAUMITOU-LAPRADE, P., STEHELIN, D., CAPRON, A, PIERCE, R., AND LAUDET, V. - Ligand binding eas acquired during evolution of nuclear receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 6803-6808, 1997.
- FABER P.W.; VAN ROOIJ, H.C.J.; VAN DER KORPUT, A.G.M.; BAARENDS W.M.; BRINKMANN, A.O.; GROOTEGOED, J.A.; AND TRAPMAN, J. - Characterization of the human androgen receptor transcription unit. **J. Biol. Chem.**, **266(17)**: 10743-10749, 1991.
- FABER, P.W.; VAN ROOIJ, H.C.J.; SCHIPPER, H.J.; BRINKMANN, A.O.; AND TRAPMAN, J. - Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. **J. Biol. Chem.**, **268(13)**: 9296-9301, 1993.
- GANGULY, A., ROCK, M.J., AND PROCKOP, D.J. - Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCr products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 10325-10329, 1993.
- GORBMAN, A. - Sex differentiation in the hagfish *Eptatretus stouti*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **77**: 309-323, 1990.
- GOTTLIEB, B.; TRIFIRO, M.; LUMBROSO, R.; AND PINSKY, L. - The androgen receptor gene mutations database. **Nucleic Acids Res.** **25(1)**:158-162, 1997.

- GRONEMEYER, H. AND LAUDET, V. – Transcription factors 3: nuclear receptors. **Protein Profiles**, **2(11)**: 1173-1308, 1995.
- HIGGINS, D.G.; THOMPSON, J.D. AND GIBSON, T.J. - Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Methods Enzymol.** **266**: 383-402, 1996.
- HIORT, O.; HOLTERHUS, P.M.; HORTER, T.; SCHULZE, W.; KREMKE, B.; BALS-PRATSCH, M.; SINNECKER, GH.; AND KRUSE, K. - Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **85(8)**:2810-2815, 2000.
- HURST, L.D. AND SMITH, N.G.C. – Do essential genes evolve slowly? **Curr. Biol.** **9(14)**: 747-750, 1999.
- KEMPER C., GIGLI I., AND ZIPFEL P.F. – Conservation of plasma regulatory proteins of the complement system in evolution: humans and fish. **Exp. Clin. Immunogenet.** **17(2)**:55-62, 2000.
- KIMURA, M. In Nei & Koehn – Evolution of genes and proteins. Sinauer. Ch 11 - The Neutral Theory of Molecular Evolution, 1983.
- KOHNO, S.; KUBOTA, S. AND NAKAI, Y. – Chromatin diminution and chromosome elimination in hagfishes. In : Jorgensen jM; Lomholt JP, Weber, RE & Matte, H, eds. **The Biology of Hagfishes**. Chapman & Hall, 378-396, 1998.
- KRAWCZAC, M., CHUZHANOVA, N.A AND COOPER, D.N. – Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. **Gene** **237**: 143-151, 1999.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; AND NEI, M. – MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Comput. appl. Biosci.** **10**: 189-192, 1994.
- LA SPADA, A.R.; WILSON, E.M.; LUBAHN, D.B.; HARDING, A.E.; AND FICHBECK, K.H. - Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar atrophy. **Nature**, **352(7)**:77-79, 1991.
- LAUDET, V.; HÄNNI, C.; COLL, J.; CATZEFLIS, F. AND STÉHELIN, D. – Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J.** **11(3)**: 1003-1013, 1992.
- LI, W-H. AND GRAUR, D. – Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., 284pp, 1991.

- LOCKER, J IN RICKWOOD, D. AND HAMES, B.D. – Transcription factors. Essential data series – Willey. Ch 2: RNA polymerase II transcription controls of animals: DNA binding sites and transcription factors. 1996.
- MARTINI, F. H. – Secrets of the slime hag. **Sci. Am.**, october: 44-49, 1998.
- MIZOKAMI, A.; AND CHANG, C. - Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA. **J. Biol. Chem.**, **269(41)**: 25655-25659, 1994.
- MONONEN, N.; SYRJAKOSKI, K.; MATIKAINEN, M.; TAMMELA, T.L.; SCHLEUTKER, J.; KALLIONIEMI, O.P.; TRAPMAN, J.; AND KOIVISTO, P.A. – Two percent of Finnish prostate cancer patients have a germ-line mutation in the hormone-binding domain of the androgen receptor gene. **Cancer Res.** **60(22)**: 6479-6481, 2000.
- NEI, M. In Nei & Koehn – Evolution of genes and proteins. Sinauer. Ch 9 - Genetic Polymorphism and the role of Mutation in Evolution, 1983.
- OKSANEN, L.; PALVIMO, J.J.; JÄNNE, OA; AND KONTULA, K. – Functional analysis of the C (-188) A polymorphism of the human leptin promoter. **Hum. Genet.** **103**: 527-528, 1998.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; AND HAYASHI, K. - Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics** **5(4)**: 874-879, 1989.
- PATZNER R. A. - Gonads and reproduction in hagfishes. **IN** : Jorgensen jM; Lomholt JP, Weber, RE & Matte, H, eds. **The Biology of Hagfishes**. Chapman & Hall, 378-396, 1998.
- PINSKY, L.; BEITEL, L.K.; KAZEMI-ESFARJANI, P.; LUMBROSO, R.; MARIE VASILIOU, D.; SHKOLNY, D.; ABDULLAH, A.A.R.; GOTTLIEB, B.; AND TRIFIRO, M.A. - Lessons from androgen receptor gene mutations that cause androgen resistance in humans. **Front. Endocrinol.**, **20**: 95-114, 1996.
- QUIGLEY, C.A.; DEBELLIS, A.; MARSCHKE, K.B.; EL-AWADY, M.K.; WILSON, E.M.; AND FRENCH, F.S. - Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocrin. Reviews**, **16(3)**: 271-321, 1995.

- RASMUSSEN, A.S.; JANKE, A.; ARNASOM, U. – The mitochondrial DNA molecule of the hagfish (*Myxine glutinosa*) and vertebrate phylogeny. **J. Mol. Evol.**,**46 (4)**: 382-8, 1998.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; AND COULSON, A.R. - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **74(12)**:5463-5467, 1977.
- Sartorato, E.L. – Estudo molecular de uma seqüência de DNA isolada do cromossomo Y humano. Campinas - SP, 1994. (Tese – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas)
- SHAIN, D.H.; ZUBER, M.X.; NORRIS, J.; YOO, J.; AND NEUMAN, T. – Selective conservation of an E-protein gene promoter during vertebrate evolution. **FEBS Lett.** **440**: 332-336, 1998.
- TAUTZ, D. – Mutations in promoters. **TIG** **16(5)**: 204-205, 2000.
- TILLEY, W.D.; MARCELLI, M.; AND MCPHAUL, M.J. - Expression of the human androgen receptor gene utilizes a common promoter in diverse human tissues and cell lines. **J. Biol. Chem.**, **265(23)**: 13776-13781, 1990.
- THORNTON, J.W. AND KELLEY, D.B. – Evolution of the androgen receptor: structure-function implications. **BioEssays** **20**: 860-869, 1998.
- TOUHATA, K., KINOSHITA, M., TOKUDA, Y., TOYOHARA, H., SAKAGUCHI, M., YOKOYAMA, Y., AND YAMASHITA, S. – Sequence and expression of a cDNA encoding the red seabream androgen receptor. **Bioch. Biophys. Acta** **1449**: 199-202, 1999.
- TRICHET V, BUISINE N, MOUCHEL N, MORAN P, PENDAS AM, LE PENNEC JP, WOLFF J.- Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. **Mol Gen Genet.** ;**263(5)**:828-37,2000.
- VENKATESH, B., GILLIGAN P., AND BRENNER, S. – Fugu: a compact vertebrate reference genome. **FEBS Letters** **476**: 3-7, 2000.
- ZHOU; YANG; AND JONG – Mini-prep in ten minutes. **Biotechniques** **8(2)**, 1990.

- WANG, Q.; GHADDESSY, F.J.; TROUNSON, A.; DE KRETZER, D.; MCLACHLAN, R.; NG, S.C.; AND YONG, E.L. - Azoospermia associated with a mutation in the ligand-binding domain of an androgen receptor displaying normal ligand binding, but defective trans-activation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **83(12)**: 4303-4309, 1998.
- WITTBRODT, J.; MEYER, A.; AND SCHARTL, M. – More genes in fishes? **BioEssays**, **20**:511-515, 1998.
- WOLFF, D.A.; HERZINGERT, T.; HERMEKING, H.; BLASCHKE, D.; AND HÖRZ, W. Transcriptional and post-transcriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. **Mol. Endocrinol.**, **7(7)**: 19004-19012, 1993.
- YOUNG, L.J.; GODWIN, J.; GRAMMER, M.; GAHR, M.; AND CREWS, D. - Reptilian sex steroid receptors: amplification, sequence and expression analysis. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **55(2)**: 261-269, 1995.

Anexo I

ANEXO I

Boi

>gi|183783|gb|M63504.1|HUMHARA Human androgen receptor gene, transcription initiation sites

Length = 420

Score = 202 bits (102), Expect = 2e-49

Identities = 232/272 (85%), Gaps = 3/272 (1%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 31  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcaccctccgagatcccagggagcc 90
      |||
Sbjct: 150  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcagccccctccgagatcccggggagcc 209
```

```
Query: 91  agtgtgctgcgagcgccggaggggtccggagcaagcctggaggcagagccagcgaccgagg 150
      ||
Sbjct: 210  agcttgctgggagagcgggacgggtccggagcaagcccagaggcagaggaggcgacagagg 269
```

```
Query: 151  g-aaagcgaacgagctagctggttccgtgcgggacaggggcctaagggacgcaccgcgtc 209
      |
Sbjct: 270  gaaaaagggccgagctagccgctccagtgtgtacaggagccgaagggacgcaccacgcc 329
```

```
Query: 210  aacccca-nngggctctggcgacagccaacgcctcttgacccgcgggcgttctaagtcg 268
      |
Sbjct: 330  agccccagcccggctccagcgacagccaacgcctcttgacagcgggcggcgttcgaagccg 389
```

```
Query: 269  ccgccccggagctgccctttcctcttcggtga 300
      |||
Sbjct: 390  ccg-cccggagctgccctttcctcttcggtga 420
```

Macaco Prego

>gi|183783|gb|M63504.1|HUMHARA Human androgen receptor gene, transcription initiation sites

Length = 420

Score = 365 bits (184), Expect = 2e-98

Identities = 249/268 (92%), Gaps = 4/268 (1%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 33  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgcccccttccgagatcccggggaggc 92
          |||
Sbjct: 150  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgcccccttccgagatcccggggaggc 209
```

```
Query: 93  agctagctgggagagcgggacggtcgggagcaagcccagaggcggaggaagcgacaga-- 150
          |||
Sbjct: 210  agcttgctgggagagcgggacggtccggagcaagcccagaggcagaggaggcgacagagg 269
```

```
Query: 151  gaaaaacggccgagctagcagntncagtgctgtacaggagccgaagggacgcaccacgcc 210
          |||
Sbjct: 270  gaaaaagggccgagctagccgctccagtgctgtacaggagccgaagggacgcaccacgcc 329
```

```
Query: 211  agccncagctcggtccggcgacagccaacgcctcttgagctcggcggttcnaagcc 270
          |||
Sbjct: 330  agccc-cagcccggctccagcgacagccaacgcctcttgagcgcggttcgaagcc 388
```

```
Query: 271  gccgcccctgagctgccctttcctcttc 298
          |||
Sbjct: 389  gccg-cccggagctgccctttcctcttc 415
```


Égua

>gi|183783|gb|M63504.1|HUMHARA Human androgen receptor gene, transcription initiation sites

Length = 420

Score = 133 bits (67), Expect = 2e-28

Identities = 103/115 (89%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 79  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgccccctctgagatcctggggagtc 138
          |||
Sbjct: 150  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgccccctccgagatcccggggagcc 209
```

```
Query: 139  agcttgctgagagaaccagaggggtcccagcaagcctggaggcacaggaggcgac 193
          |||
Sbjct: 210  agcttgctgggagagcgggacggtccgagcaagcccagaggcagaggaggcgac 264
```

Score = 127 bits (64), Expect = 1e-26

Identities = 119/136 (87%), Gaps = 1/136 (0%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 196  agccgcttcagtgcgggacaggagccgaagggagccaccgcgtaacccccagaccgctc 255
          |||
Sbjct: 286  agccgctccagtgctgtacaggagccgaagggacgcaccacgcccagccccagcccggctc 345
```

```
Query: 256  tggcgacagccaacgccttttgagtgaggcggcttctaagccgctgccccggagctgcc 315
          |||
Sbjct: 346  cagcgacagccaacgcctcttgagtgaggcggcttctaagccgctgccccggagctgcc 404
```

```
Query: 316  ctttcctcttcggtga 331
          |||
Sbjct: 405  ctttcctcttcggtga 420
```

Peixe (*Eptatretus sp*)

>gi|183783|gb|M63504.1|HUMHARA Human androgen receptor gene, transcription initiation sites

Length = 420

Score = 230 bits (116), Expect = 4e-58
Identities = 165/182 (90%), Gaps = 2/182 (1%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 99  tcgcaaaactgttgcatttgctctccanccccagcgccccctccgagatcccggggagcc 158
          |||
Sbjct: 150  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgccccctccgagatcccggggagcc 209
```

```
Query: 159  agcttgctggnagagcggnacgggtcccagagcaagctccagangcatnaggaggcgataga 218
          |||
Sbjct: 210  agcttgctgggagagcgggacgggtccggagcaagc-ccagaggca-gaggaggcgacaga 267
```

```
Query: 219  ggnaaaaaggcctagctagccgttcnagtgntgtacaggagcngaanggacgcaccacg 278
          |||
Sbjct: 268  gggaaaaaggcctagctagccgtccagtgtgtacaggagccgaagggacgcaccacg 327
```

```
Query: 279  cc 280
          ||
Sbjct: 328  cc 329
```

>gi|469514|emb|X78592.1|HSARP H.sapiens DNA for androgen-receptor-promoter

Length = 6905

Score = 222 bits (112), Expect = 1e-55
Identities = 164/182 (90%), Gaps = 2/182 (1%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 99  tcgcaaaactgttgcatttgctctccanccccagcgccccctccgagatcccggggagcc 158
          |||
Sbjct: 5746  tcgcaaaactgttgcatttgctctccacctcccagcgccccctccgagatcccggggagcc 5805
```

```
Query: 159  agcttgctggnagagcggnacgggtcccagagcaagctccagangcatnaggaggcgataga 218
          |||
Sbjct: 5806  agcttgctgggagagcgggacgggtccggagcaagc-ccacaggca-gaggaggcgacaga 5863
```


Galinha

>gi|4902757|emb|AL049564.10|HSDJ808O4 Human DNA sequence from clone RP4-808O4 on chromosome Xq11.1-12.

Contains the 5' end of the AR gene for androgen receptor (dihydrotestosterone receptor), a PABPN1 (poly(A)-binding protein, nuclear 1) (PABP2) pseudogene, ESTs STSs, GSSs and two putative>

Length = 139033

Score = 155 bits (78), Expect = 4e-35

Identities = 226/273 (82%), Gaps = 5/273 (1%)

Strand = Plus / Minus

```
Query: 52      tcgcaaactggttgcatTTGCTCTCCACCTCCAGCGCCCCTCCGAGATCCAGGGAGCC 111
              |||
Sbjct: 36103  tcgcaaactggttgcatTTGCTCTCCACCTCCAGCGCCCCTCCGAGATCCAGGGAGCC
36044
```

```
Query: 112     agcgtgcccggagagctggagggTCCCGAGCTANCCGGGAGGCANAAGAGGCAGAAGAGG 171
              |||
Sbjct: 36043  agcttGCTGGGAGAGCGGGACGGTCCGGAGCAAGCCCAGAGGCAGAGGAGGCGACAGAGG
35984
```

```
Query: 172     --aaagagaccgagctagcagctccagTGTGGGACAGGAGCTGAAGGGACATACCGCGTC 229
              |||
Sbjct: 35983  gaaaaagggccgagctagccgctccagTGTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCACGCC
35924
```

```
Query: 230     aacccagctgggctccggcgaccgccaaggctTTTGCAGCGCGGCGGCT--aacgccg 287
              |||
Sbjct: 35923  agccccagcccggctccagcgacagccaacgcctctTGCAGCGCGGCGGCTTcgaagccg
35864
```

```
Query: 288     ccgcctcagagctgncctttcctcttcagTgaa 320
              |||
Sbjct: 35863  ccgcc-cggagctgccctttcctcttcagTgaa 35832
```

Artigo submetido

**RARITY OF MOLECULAR ALTERATIONS IN THE PROMOTER REGION OF THE
HUMAN ANDROGEN RECEPTOR GENE.**

Daniela Farias Cabral¹, Andrey dos Santos¹, Marcelo Lima Ribeiro¹, José
Carlos Mesquita², Andréa Borduchi Carvalho-Salles³ & Christine Hackel^{1,4}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG/UNICAMP

²Serviço de Urologia/FAMERP

³Hemocentro de São José do Rio Preto and

⁴Departamento de Genética Médica - FCM/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Send Correspondence to:

CHRISTINE HACKEL

Departamento de Genética Médica, CP 6111

FCM/UNICAMP

13081-970 Campinas, SP, BRAZIL

Phone: 55-19-3788-1145 Fax 55-19-3788-1089

e-mail: hackel@unicamp.br

Abstract

The androgen receptor mediates the physiologic response to testosterone and dihydrotestosterone, and has a fundamental role at the male sexual development and maintenance of male secondary sex characters. In order to understand the factors that control the androgen receptor gene (*AR*) expression during embryogenesis and adult life, the human *AR* promoter region was isolated and characterized *in vitro* by Tilley *et al.* (1990). This gene has a 5' UTR long region, suggesting that the sequence downstream to the transcription initiation sites (TIS) is necessary to the gene expression. One important characteristic is the absence of the TATA and CCAAT boxes in the promoter region. The analysis of promoter sequences in eukaryotes shows the existence of polymorphisms that could be associated with diminished or amplified gene expression levels. The purpose of present work is the verification of the presence or absence of polymorphisms within the *AR*-5'UTR region in healthy blood donors individuals and prostate cancer patients, by CSGE screening and sequencing. The results reveal that the region is extremely conservative, with high selective pressure. Only one mutation was detected among the blood donor individuals, and absolutely none among the prostate cancer patients.

Key words: Human Androgen Receptor gene / Polymorphisms/ Promoter region/ Prostate cancer/ 5'-untranslated region

Introduction

The androgen receptor protein (AR) is essential for androgen action, since it binds either testosterone or its 5 α -reduced metabolite, 5 α -dihydrotestosterone. Thus, the androgen receptor gene (*AR*) plays an essential role in the development of male sexual characteristics (Quigley *et al.*, 1995).

This ligand-activated receptor belongs to a super family of genes that encode receptors for steroid hormones as well orphan receptor proteins (Baker *et al.*, 1997). The human *AR* (*hAR*) gene is localized in the X chromosome, at position Xq11-12, comprising 8 exons and with a relatively long 5' untranslated region (5'UTR) (Pinsky *et al.*, 1996).

The *hAR* promoter has several specific features in common with the members of the nuclear receptors super family, since the majority of these members do not have the characteristic TATA or CAAT box elements. This super family contains multiple transcription start sites, and the promoter region is G+C rich with multiple putative GC-box consensus sequences, such as the SP1 protein-binding site (Tilley *et al.*, 1990).

There are few studies of the nuclear receptor promoters, compared with other studies of nuclear receptors structure-function. Sequence

conservation in promoter regions is usually held to be an indicator of functional importance (Crawford *et al.*, 1999). Up to now the promoter region of the *AR* gene was characterized only in humans, mouse and rat, revealing to be conservative at the TIS region. The alignment of these sequences shows similarity among them, starting from base – 1044 to –1609 of the human gene (numbering according to Tilley *et al.*, 1990). The similarity score is higher from base –1044 to –1269, fairly where the TIS regions and GC box are localized.

The action of the androgens in the development and growth of prostate carcinomas is well documented. The AR facilitates androgen-induced regulation of genes involved in cellular proliferation and differentiation. Mutations that alter AR conformation, function, and regulation may provide a selective growth advantage for subpopulations of cells within the tumor that are able to proliferate in an androgen-deprived environment (Cude *et al.*, 1999).

Since the 5'UTR region may play a role in translation control, protein expression could be also modulated by polymorphisms in the normal male population. In addition, a previous report of two germ-line point mutations in the 5'UTR of the *hAR* gene in men with prostate cancer (Crocitto, *et al.*, 1997) suggest that alterations in this region may contribute to this disease. We therefore evaluate the variability of this region in healthy individuals and in prostate cancer patients from a Brazilian population.

Materials and Methods

For the present study, blood samples were obtained from 100 patients evaluated at the Urology Outpatients Clinic from the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, where the diagnosis of adenocarcinoma of the prostate was established by one of the authors (JCM). The age of these patients ranged from 43 to 96 years old. The DNA samples of 100 male healthy individuals were obtained from blood donors at the Hemocentro of the State University of Campinas, São Paulo, Brazil. The age of these individuals ranged from 18 to 58 years old. In all cases, the blood samples were collected only after given informed written consent.

Genomic DNA was extracted from white blood cells by phenol-chloroform method (Araújo *et al.*, 1996). The amplification reaction was performed using 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl); 1.5mM MgCl₂; 200 mM of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 20 pMol of each primer set, 500 ng of genomic DNA and 1U of Taq DNA polymerase. The healthy individuals DNA amplification were performed using four different primer sets to cover around 1,3 kb of the promoter region (table 1). In the cancer prostate patients, only the most conservative portion of the promoter region was analyzed, by amplification with the pairs of primers 1S/2AS and 3S/4AS.

CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) was performed using a 10 μ l mixture of the PCR product from a control individual with the PCR product of each sample, using 10% acrylamide gel with 1,4-Bis(acryloyl)piperazine, formamide 15% and ethylenglycol 10% (Ganguly *et al.*, 1993). CSGE gel was run at 300 V for 16 hours at room temperature and colored by ethidium bromide. The specimen with CSGE band shifts was sequenced using the Thermosequenase DNA Sequencing system (Amersham Life Science, Inc. Cleveland, Ohio), according to the manufacturer's recommendations.

Results

CSGE band shift (figure 1) was evident in only one of the hundred blood donor individuals analyzed, with the product of primers 3S/4AS. A T (+36, according Tilley *et al.*, 1990) deletion was located 24 bases downstream from the TIS I (figure 2). No band shifts were detected in the patients with prostate cancer.

Discussion

The AR, required for the development of male secondary sex characteristics, belongs to the steroid subgroup, and its functional domains are well established and characterized. The *AR* gene has also an NH₂-terminal region, required for transcriptional activation (Choong *et al.*, 1998). Several trinucleotide repeat sequences of unknown function are found at the first exon of *hAR* that codes for the NH₂-terminal region. There is one polymorphic glutamine repetition beginning at codon 58 in humans, and its expansion is associated with the Kennedy's disease (Edwards, *et al.*, 1992; La Spada *et al.*, 1991), while shorter CAG repeat lengths were found to correlate with increased risk of aggressive prostate cancer (Giovannucci *et al.*, 1997).

Most of the molecular alterations detected in patients with prostate cancer are somatic mutations at coding regions. They are distributed all over the *hAR* gene (<http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>). A total of 61 *AR* mutations were found in prostatic cancer tissue. Among these only 4 are germ-line mutations (Gottlieb *et al.*, 1997). One of them, a germ-line mutation at codon 726 in exon 5 (R726L), was detected in two apparently unrelated Finnish prostate cancer patients (Mononen *et al.*, 2000). Another germ-line mutation is the glutamine to glutamic acid substitution at position 798 (Q798E), which occurs at exon 6 (Evans *et al.*, 1996), and was also described in two patients with Partial Androgen

Insensitivity Syndrome - SIPA (Quigley *et al.*, 1995; Bevan *et al.*, 1996) and in two individuals with azoospermy (Wang *et al.*, 1998 ; Hiort *et al.*, 2000).

The other two germ-line mutations, characterized by Crocitto *et al.* (1997), were respectively located within the *hAR* transcription initiation site I (AR-TIS I) and within the GC rich region of the 5' UTR. These molecular alterations could be associated with a possible factor that increases the risk of prostate cancer predisposition, as well as with the regulation of gene expression. According these authors, mutations (even rare) within 5' UTR region could contribute to the prostate cancer etiology, changing the transcription and/or translation gene rates.

In the present work, only one mutation was detected, a T deletion at position +36, downstream to TIS I site. This mutation is localized in the same region where Crocitto *et al.* (1997) described the two germ-line 5' UTR mutations. The deletion was detected in one healthy blood donor 45 years old individual, father of three children. In such a situation, it is extremely difficult to evaluate if this deletion, localized between the TIS sites and a GC rich sequence, could be innocuous or compromise the function of *AR* gene. Since only one mutation was detected, we can consider that this region is extremely homogeneous and conservative, by vital selective pressure. Moreover, the total absence of detectable variation within the 5' UTR region among the 100 prostate cancer

patients corroborates the idea of homogeneity of this region, indicating a low probability of its involvement with the prostate cancer etiology.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Hematology-Hemotherapy Center of the State University of Campinas for allowing the access to the blood donors. This work was supported by grants to *CH* from Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP) from UNICAMP. *CH* received research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq. Posgraduated fellowhip was granted by Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to *DFC*.

References

Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra Jr G, Farah SB, De Mello MP (1996) Molecular Analysis of CYP21 and C4 Genes in Brazilian Families with Classical Congenital Adrenal Hyperplasia. *Brazilian J Med Biol Res* 29: 1-13

Baker ME (1997) Steroid receptor phylogeny and vertebrate origins. *Mol Cell Endocrinol* 135: 101-107

Bevan CL, Brown BB, Davies HR, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson, MN (1996) Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 5(2):265-273

Choong CS, Kemppainen JA, Wilson EM (1998) Evolution of the primate androgen receptor: a structural basis for disease. *J Mol Evol* 47: 334-342

Crawford DL, Segal JA, Barnett JL (1999) Evolutionary analysis of the TATA-less proximal promoter function. *Mol Biol Evol* 16(2): 194-207

Crocitto LE, Henderson BE, Coetzee GA (1997) Identification of two germline point mutations in the 5' UTR of the androgen receptor gene in men with prostate cancer. *J Urol* 158: 1599-1601

Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg WD (1999) The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med* 77: 419-426

Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey T, Chakraborty R (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12: 241-153

Evans BA, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J, Griffiths K (1996) Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* 28(3): 162-171

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ (1993) Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10325-10329

Giovannucci E, Stampfer M, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens C, Kantoff P (1997) The CAG repeat within the androgen receptor and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 3320-3323

Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, Pinsky L (1997) The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res* 25(1):158-162

Hiort O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GH, Kruse K (2000) Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8):2810-2815

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fichbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar atrophy. *Nature* 352(7):77-79

Mononen N, Syrjakoski K, Matikainen M, Tammela TL, Schleutker J, Kallioniemi OP, Trapman J, Koivisto PA (2000) Two percent of Finnish prostate cancer patients have a germ-line mutation in the hormone-binding domain of the androgen receptor gene. *Cancer Res* 60(22):6479-6481

Pinsky L, Beitel LK, Kazemi-Esfarjani P, Lumbroso R, Marie Vasiliou D, Shkolny D, Abdullah AAR, Gottlieb B, Trifiro MA (1996) Lessons from androgen receptor gene mutations that cause androgen resistance in humans. *Front Endocrinol* 20: 95-114

Quigley CA, DeBellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* 16(3): 271-321

Tilley WD, Marcelli M, McPhaul MJ (1990) Expression of the human androgen receptor gene utilizes a common promoter in diverse human tissues and cell lines. *J Biol Chem* 265(23): 13776-13781

Wang Q, Ghadessy FJ, Trounson A, de Kretser D, McLachlan R, Ng SC, Yong EL (1998) Azoospermia associated with a mutation in the ligand-binding domain of an androgen receptor displaying normal ligand binding, but defective trans-activation. *J Clin Endocrinol Metab* 83(12): 4303-4309

Figures

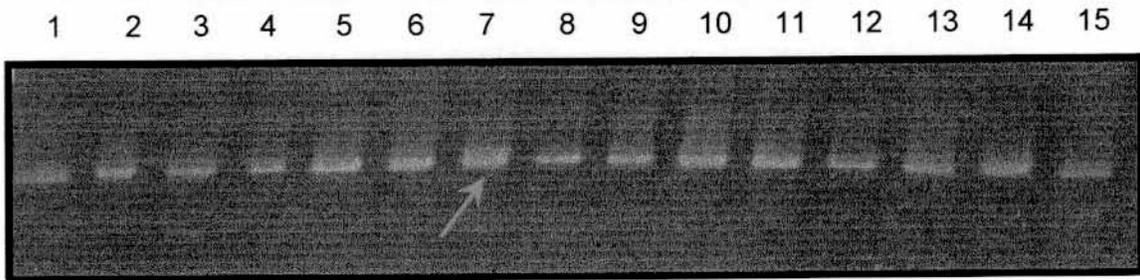


Figure 1: CSGE of 3S/4AS set primer PCR product. The arrow indicates the differential band pattern migration.

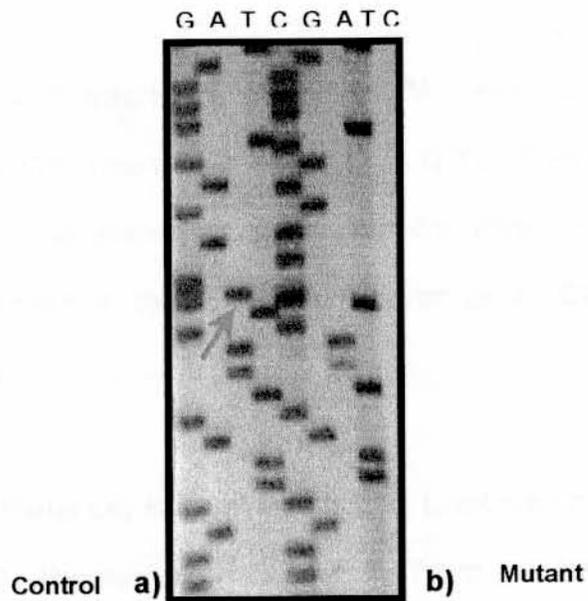


Figure 2: Manual sequencing to detect the mutation that causes the differential migration pattern in CSGE. The four lanes at the left correspond to the normal promoter gene sequence. The four lanes at the right correspond to the blood donor's sample where the shift was detected. The arrow indicates the presence of the T base in the normal sequence.

Table 1: Primers sequences used to amplify the AR 5' UTR promoter region in blood donors and cancer prostate patients.

Primers	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature	References
1S	GTGAGTGTGGCCTCCAGGA	424	64 °C	This work
2AS	GAGGTCACGACATGTCTCCTCGGC			
3S	GTTGCAATTTGCTCTCCACCTCCC	261	60 °C	This work
4AS	TCACCGAAGAGGAAAGGGCAGCTC			
5'UTR2-S	CTTCGAAAGCCCGCCCGCCCGG	351	62 °C	Crocitto <i>et al.</i> , 1997
5'UTR-AS	TTCCTCCGAGAAATCCCTCCGT			
7S	TGCAGAGAGGTAACCTCCCTTTG	489	64 °C	This work
8AS	CGCTCTGAGAGCCTCAAAGTC			

S – sense AS – antisense bp – base pairs.