

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

CLONAGEM DO cDNA DA HORMONA PROLACTINA DE DOURADA  
(*Sparus aurata*)

Maria de Nair Enxerto

FARO  
1997



TESES  
SD

Clonagem do cDNA da  
hormona prolactina de  
dourada (*Sparus aur-*  
Enxerto,



f. 2013

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**CLONAGEM DO cDNA DA HORMONA PROLACTINA DE DOURADA  
(*Sparus aurata*)**

Dissertação final do  
Curso de Mestrado em Química Celular

**Maria de Nair Enxerto**

**FARO  
1997**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

10/07/00	315.30
592	
LIX - C10	

539 47

## Agradecimentos

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Doutora Deborah M. Power, pelos excelentes ensinamentos, fornecimento de bibliografia, incentivo e optimismo permanentes, em particular, nos momentos mais difíceis e pela correcção cuidadosa e criteriosa do manuscrito, sem os quais este trabalho não teria sido feito. Ao Prof. Doutor Adelino Canário, pela grande disponibilidade no apoio informático. À Dr<sup>ª</sup> Cecília Santos pelos seus ensinamentos e sugestões. A todos os colegas do laboratório G22, pelo óptimo ambiente de trabalho e partilha de algumas tarefas. A Hilary Holden, (University of Sheffield Medical School, U.K.), que efectuou a sequenciação automática. Ao Conselho Pedagógico da Escola Secundária Poeta António Aleixo, pelo seu voto de confiança ao me ter autorizado a concorrer à situação de equiparação a bolseiro e ao Ministério da Educação por me ter concedido esse privilégio. Ao Francisco, pela compreensão que mostrou durante as minhas ausências. Aos meus pais, pela permanente ajuda e apoio incondicionais a todos os níveis e por compreenderem as minhas ausências, a eles, tudo devo e a eles dedico este trabalho.

## RESUMO

A hormona prolactina, produzida pela adenohipófise, pertence a uma família que inclui os lactogénios placentais (PL), a hormona do crescimento (GH), a somatolactina (SL) e os “citokines”. Para se conhecer a relação filogenética entre estas hormonas distintas, mas relacionadas nas suas estruturas e funções, é necessário obter mais informação acerca da estrutura primária das suas proteínas e sequência dos seus genes, de um maior número de espécies. Em relação àquelas hormonas, nos peixes teleósteos, há poucas sequências das proteínas e dos respectivos DNAs e, contudo, são conhecidos mais de 20.000 espécies de teleósteos. O objectivo do presente estudo foi determinar a sequência do cDNA da PRL, num peixe teleósteo, a dourada, (*Sparus aurata*).

Por PCR, usando *primers* degenerados e heterólogos foi produzida um fragmento de 361bp, a partir de cDNA, sintetizado de RNA de pituitária. A sequência dos *primers* foi determinada a partir da análise de sequências da proteína e de cDNA de PRL de diversas espécies. O fragmento 316bp foi clonado no vector pGEM-T e a sua sequenciação confirmou a sua identidade: sonda para PRL. A sonda foi utilizada em hibridização *in situ* em cortes histológicos de pituitária tendo localizado apenas as células que, na RPD da adenohipófise, produzem a PRL. As células produtoras de PRL tinham sido previamente localizadas por imunocitoquímica. A sonda foi, também, usada para rastrear um banco de cDNA de pituitária construído em  $\lambda$  Zap II, com  $16 \times 10^8$  de recombinantes. Foram identificados seis clones positivos que, submetidos a “Southern blotting”, com a sonda de PRL, se revelaram pela intensidade da hibridização, ser PRL ou hormonas da mesma família. Um dos clones, que apresentava maior tamanho mas menor hibridização com a sonda, foi sequenciado para determinar a sua identidade, tendo-se verificado tratar-se de somatolactina. Os restantes clones estão a ser caracterizados.

## ABSTRACT

Prolactin (PRL) the adenohipophysial hormone belongs to a family which includes placental lactogens (PL), growth hormone (GH), somatolactin (SL) and cytokines. In order, to understand the evolution of distinct structure/function of these hormones information on their primary structure and DNA sequence is required from diverse species. Relatively little data is available about the sequence of these hormones in teleost fish, (of which there are over 20.000 species). The objective of the present study therefor was to determine the cDNA sequence of prolactin in a teleost the sea bream, (*Sparus aurata*).

A probe was generated for sea bream prolactin by PCR using degenerate primers designed by comparison of the sequence of PRL from different species. cDNA prepared from RNA isolated from the pituitary gland was subject to PCR and resulted in a product of 361bp which was cloned into pGEM-T vector and sequenced to confirm its identity. Use of the probe in *in situ* hybridisation of pituitary gland showed it was localised only in the RPD within PRL cells which had previously been identified by immunocytochemistry. The probe was used to screen a sea bream pituitary gland library of  $16 \times 10^8$  recombinants which was construed in  $\lambda$  Zap II. Six positive clones were identified, isolated and subjected to Southern blotting using the PRL probe which confirmed their identity as PRL or closely related hormones. One of the clones, which hybridised weakly with the PRL probe was found to correspond to somatolactin. The other clones are currently undergoing farther characterisation.

## ÍNDICE

### Abreviaturas

### INTRODUÇÃO

1 Introdução geral	1
2 A Glândula pituitária	3
3 A Hormona prolactina (PRL)	4
3.1 Funções da PRL	6
4 A Hormona do crescimento (GH)	8
4.1 Funções da GH	9
5 A Hormona somatolactina (SL)	10
5.1 Funções da SL	11
6 Breve comparação entre os cDNAs de PRL, GH e SL	11
7 Objectivos	13

### PARTE I- Produção de uma sonda homóloga para a detecção do cDNA da hormona prolactina

A Introdução	14
B Métodos	16
1 Determinação da sequência dos <i>primers</i>	16
1.1 <i>Primers</i>	18
2 Extracção de RNAtotal	19
3 Síntese de cDNA	20
4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	20
5 Avaliação dos produtos do PCR em gel de agarose	22
5.1 Excisão e purificação da banda pretendida	23
6 Clonagem	23
7 Confirmação da clonagem	25
8 Sequenciação de cDNA	26
C Resultados	29
1 Extracção de RNAtotal	29
2 PCR	30
3 Confirmação da clonagem	31
4 Sequenciação	32

### PARTE II - Hibridização *in situ* para confirmação da funcionalidade e especificidade da sonda, fragmento de cDNA codificante de PRL

A Introdução	37
B Métodos	41
1 Preparação da sonda reversa de RNA	41
2 Pré-hibridização de cortes histológicos de pituitária	41
3 Hibridização e detecção dos híbridos	43
C Resultados	45

**PARTE III- Produção de um banco de cDNA, de pituitária de dourada em bacteriófagos  $\lambda$**

A Introdução	48
B Métodos	51
1 Obtenção de RNAmensageiro por Cromatografia de Afinidade	51
2 Síntese de cDNA	51
3 Clonagem dos fragmentos de cDNA no vector	52
4 Introdução dos vectores nas cápsulas fágicas	53
5 Titulação dos bancos BM1 e BM2	54
6 Amplificação dos bancos BM1 e BM2	55
7 Titulação do banco amplificado (BpitA)	55
8 Cálculo da percentagem de recombinantes do banco BpitA	56
9 Rastreio do banco BpitA	57
10 Sequenciação automática	62
B Resultados	63
1 Quantificação do RNAm obtido por Cromatografia de Afinidade	63
2 Quantificação da síntese de cDNA	64
3 Título dos bancos BM1 e BM2	64
4 Título do banco ampliado - BpitA	64
5 Cálculo da percentagem de recombinantes	65
6 PCR dos lisados do rastreio secundário e Southern-Blot	65
7 Análise do Southern-Blot	67
8 Sequenciação automática do <i>insert</i> de 1000bp	69
<b>DISCUSSÃO</b>	73
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	80
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	81

## Abreviaturas

BCIP - 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl Fosfato

bp - pares de bases

cDNA - DNA complementar

ddNTP- 2',3'didesoxinuclotídeo

Depc - dietil-pirocarbonato

DMF- Dimetil formamida

DNAp- DNApolimerase

dNTP- 2'desoxinucleotídeo

dsDNA- DNA de cadeia dupla

GH - Hormona do crescimento

IPTG - isopropil-beta-D-tiogalactósido

KDa - KiloDalton

NBT- Nitrobluetetrazona

ORF - pauta de leitura codificante

PRL - Prolactina

RF- pauta de leitura

RNA<sub>m</sub> - RNA mensageiro

RNA<sub>p</sub> - RNApolimerase

RNA<sub>t</sub> - RNA total

RNA<sub>tf</sub> - RNAttransferência

SDS - Dodecil-Sulfato de Sódio

SL - Somatolactina

SSC - citrato de sódio "standard"

ssDNA- DNA de cadeia simples

TAE - Tris acetato EDTA

TBE - Tris acetato EDTA

TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

Tween 20 - Polyoxiethylene sorbitan monolaurate

X-Gal - 5-cloro-4-bromo-indolil-beta-d-galactosidase

## INTRODUÇÃO

---

## 1-Introdução geral

O controlo homeostático de um organismo superior do reino Animalia depende da acção, conjunta, coordenada e por vezes em sobreposição, dos sistemas endócrino e nervoso. Estes dois sistemas tornando o organismo capaz de receber, interpretar e responder a estímulos internos e externos, são essenciais para a coordenação dos processos fisiológicos. A coordenação fisiológica conduz à autorregulação necessária para a adaptação, dentro de certos limites, às alterações dos meios interno e externo, que em última análise, conduzem à sobrevivência dos seres vivos.

Surge, assim, o conceito de regulação neuroendócrina. Segundo este conceito a homeostasia do organismo é mantida pela acção de um complexo sistema de comunicação, ao nível celular entre os diferentes tecidos/células, feita por neurohormonas, neurotransmissores e hormonas. Estes transmissores de informação, com acções que podem ser do tipo endócrino, parácrino e autócrino, (Hadley, 3rd Ed.), promovem o seu efeito em células alvo. O seu reconhecimento ao nível celular é feito através de receptores, membranares ou citoplasmáticos/nucleares, específicos, (Wendelaar-Bonga, S. E. *in* Physiology of Fishes, 1993).

A partir da década de 70 a pesquisa neuroendócrina sofreu grandes avanços, devido à utilização de técnicas tais como: sequenciação de proteínas, de genes e de ácidos ribonucleicos mensageiros via DNA seu complementar; imunocitoquímica; hibridização *in situ*; imunologia. A utilização destas técnicas veio aumentar grandemente o conhecimento sobre as hormonas, não só a descoberta de novas moléculas, como a identificação de diferentes isoformas de outras já conhecidas. O conceito clássico, da produção das hormonas ser feita por glândulas endócrinas, tem sido posto em causa, com a identificação de novos órgãos/tecidos, tidos como não endócrinos, mas que, se têm revelado sintetizadores de hormonas.

Diversas hormonas, por apresentarem estruturas semelhante e desempenharem algumas funções comuns, têm sido consideradas como pertencentes a famílias com ancestral filogenético comum, tal como os organismos, Figura 1.

Devido aos graus de homologia e similitude dos genes, considera-se que, nos peixes as hormona prolactina (PRL), hormona do crescimento (GH) e somatolactina, (SL), detectada apenas nesta super-classe de vertebrados, pertencem à mesma família. Também, nesta família se incluem os lactogénios placentais, (PL), segregados pelas células do sinciotrofoblasto nos mamíferos. Todas elas terão tido origem num ancestral comum, por evolução divergente, (Linzer and Nathans, 1984; Linzer *et al.*, 1985, in Chang Y. S. *et al.*, 1992). Os genes de GH e PRL terão divergido de um gene ancestral comum, há cerca de 400 milhões de anos, uma vez que ambas existem em peixes, Figura 1, (Power *et al.*, 1994; Goffin, V. *et al.*, 1996).

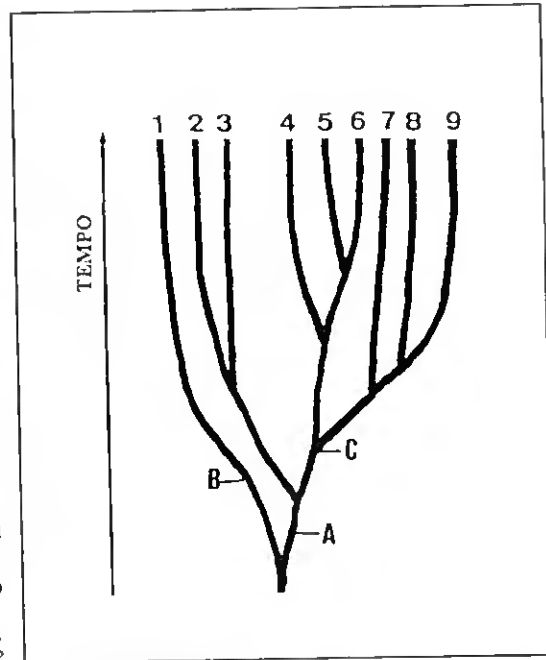
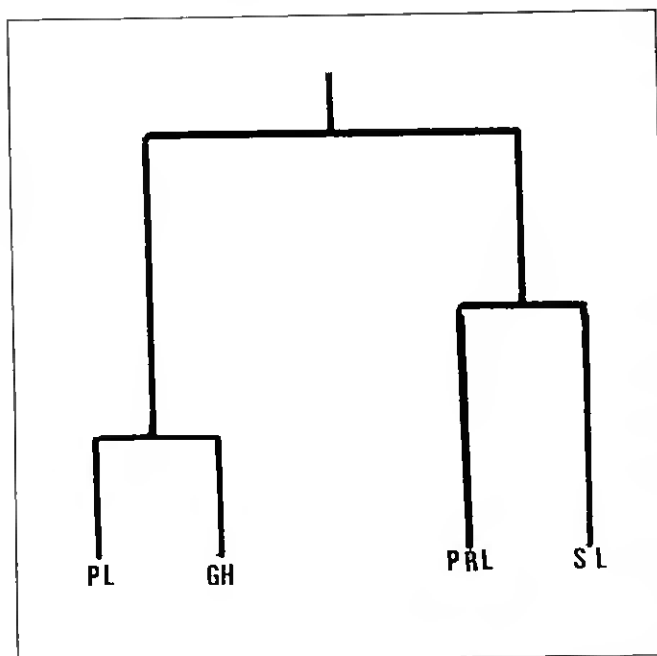


Figura 1-(Adaptado de Power D. M., *et al.*, 1994). Árvore filogenética onde se pretende pôr em evidência a relação parental entre Teleósteos e Tetrápodes. 1- Ciclostomos; 2- Seláceos; 3- Holocéfalos; 4- Condrósteos; 5- Holósteos; 6- Teleósteos; 7- Dipnóicos; 8- Crossopterígeos; 9- Tetrápodes. A-Peixes com mandíbulas; B-Peixes sem mandíbulas; C-Peixes ósseos.

Tendo como base o alinhamento das proteínas de SL, GH, PRL e PL, análises das sequências dos seus RNAmensageiro,(RNAm), e DNAComplementar, (cDNA), de



alguns animais, Ono M. *et al.*,(1990), sugeriram que o gene de SL teria divergido depois da duplicação génica que originou GH e PRL. Mas, muito antes da divergência de PL, pois esta só foi encontrada nos mamíferos, e SL só foi ainda, detectada em peixes, Figura 2.

Figura.2 - (Adaptado de Power D. M., *et al.*, 1994) Cladograma representativo das relações filogenéticas entre as hormonas PRL, GH, SL e PL.

## 2-A Glândula Pituitária

A pituitária é uma glândula endócrina com origem ectodérmica, que estando presente em todos os vertebrados é, em todos eles, semelhante no que respeita à sua divisão em neurohipófise (NHP) e adenohipófise (AHP). A neurohipófise recebe, armazena e liberta neurotransmissores produzidos pelas células neuroendócrinas do hipotálamo, enquanto a adenohipófise produz hormonas peptídicas.

Em relação a este trabalho, interessa-nos a estrutura e acção da adenohipófise dos teleósteos, enquanto responsável pela expressão genética de algumas hormonas da família a que pertencem a prolactina, (PRL), a hormona do crescimento, (GH), e a somatolactina, (SL).

A adenohipófise está dividida em três regiões: a *rostral pars distalis*, a *proximal pars distalis* e a *pars intermédia*. A neurohipófise não forma um lobo definido mas antes, introduz-se profundamente na *pars intermédia*. A Figura 3 representa a hipófise dos teleósteos.

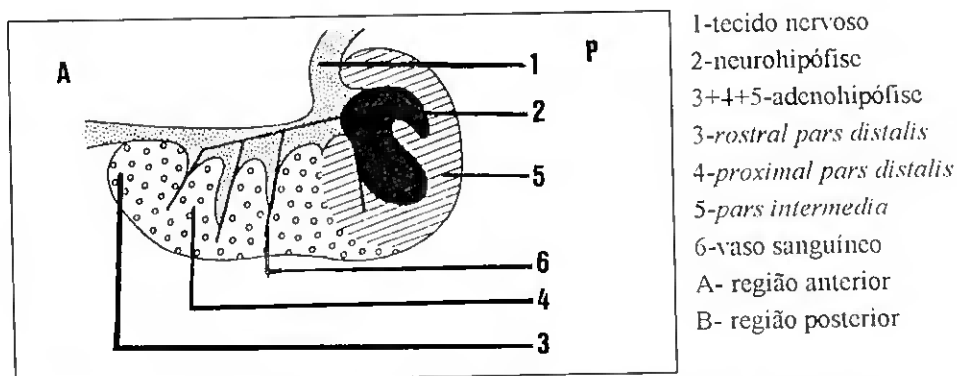


Figura 3 - Corte sagital da hipófise dos teleósteos, (extraído de Bentley, P. J., 1982).

As células secretoras de GH localizam-se na região *proximal pars distalis* (PPD); as produtoras de PRL na região *rostral pars distalis* (RPD) (Bentley, 1982). As células produtoras de SL localizam-se na *pars intermedia* (Zhu, Y. *et al.*, 1995).

Esta zonação de células com diferentes funções, que observada nos teleósteos não se verifica nos peixes dipnóicos nem nos tetrápodes, tem feito destes animais um modelo útil para o estudo das referidas células, (Nishioka, R. S. *et al.*, 1993). No que respeita à irrigação sanguínea da adenohipófise, os teleósteos não apresentam o sistema porta hipotálamo-hipófise, típico dos restantes vertebrados sendo a irrigação

daquela região feita por sangue proveniente da neurohipófise, conforme se observa na Figura 3.

### 3-A Hormona Prolactina (PRL)

Prolactina foi a primeira designação dada, em 1928, ao extracto de pituitária que se sabia promover a lactação e a pseudogravidez em fêmeas de ratos, tendo-se admitido que aquela seria a sua única função. No início dos anos 70 a PRL foi identificada como sendo uma hormona individualizada da GH, ambas provenientes da pituitária. Recentemente foi demonstrado que, em mamíferos, a hipófise não é a única glândula que sintetiza PRL. Mershon *et al.* (1995), demonstraram que células tumorais de glândulas mamárias de rato expressam RNAmensageiro de PRL. O seu peso molecular, variando entre os 23-24 KiloDaltons (KDa), foi primeiramente estabelecido a partir de estudos com ovinos. Em alguns peixes e em representantes de todas as classes dos tetrápodes a sequência de aminoácidos da hormona PRL já foi determinada por sequenciação da proteína ou, por dedução, através da análise da sequência do seu cDNA. Nos teleósteos, apresenta cerca de 21KDa, 197 a 199 resíduos de aminoácidos e 4 cisteínas que formam duas pontes bissulfito, enquanto nos tetrápodes apresenta uma terceira ponte bissulfito no terminal amina, Figura 4.

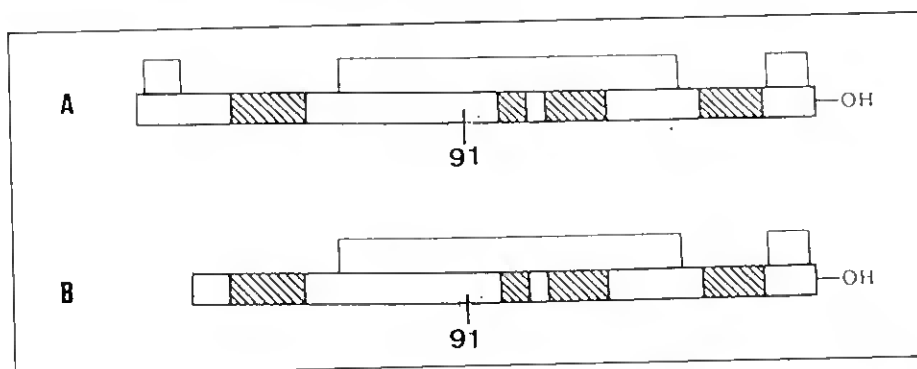


Figura 4 - Representação esquemática da PRL de tetrápodes. (A). e de peixes. (B). Os arcos indicam as pontes bissulfito: duas nos peixes e uma terceira no terminal amina da PRL de tetrápodes. Nos dois esquemas estão referenciados o locus 91 onde se localiza, tipicamente, um resíduo de triptofano. (Adaptado de Bentley, 1982)

A terceira ponte bissulfito dos tetrápodes forma-se nos 12 primeiros resíduos de aminoácidos do terminal amina, os quais faltam nos peixes. Pelo alinhamento de diversas PRLs verifica-se que as 4 cisteínas das PRLs de peixes têm a mesma posição das dos tetrápodes, conforme se observa na Figura 5, onde se representa o alinhamento das PRLs de alguns animais.

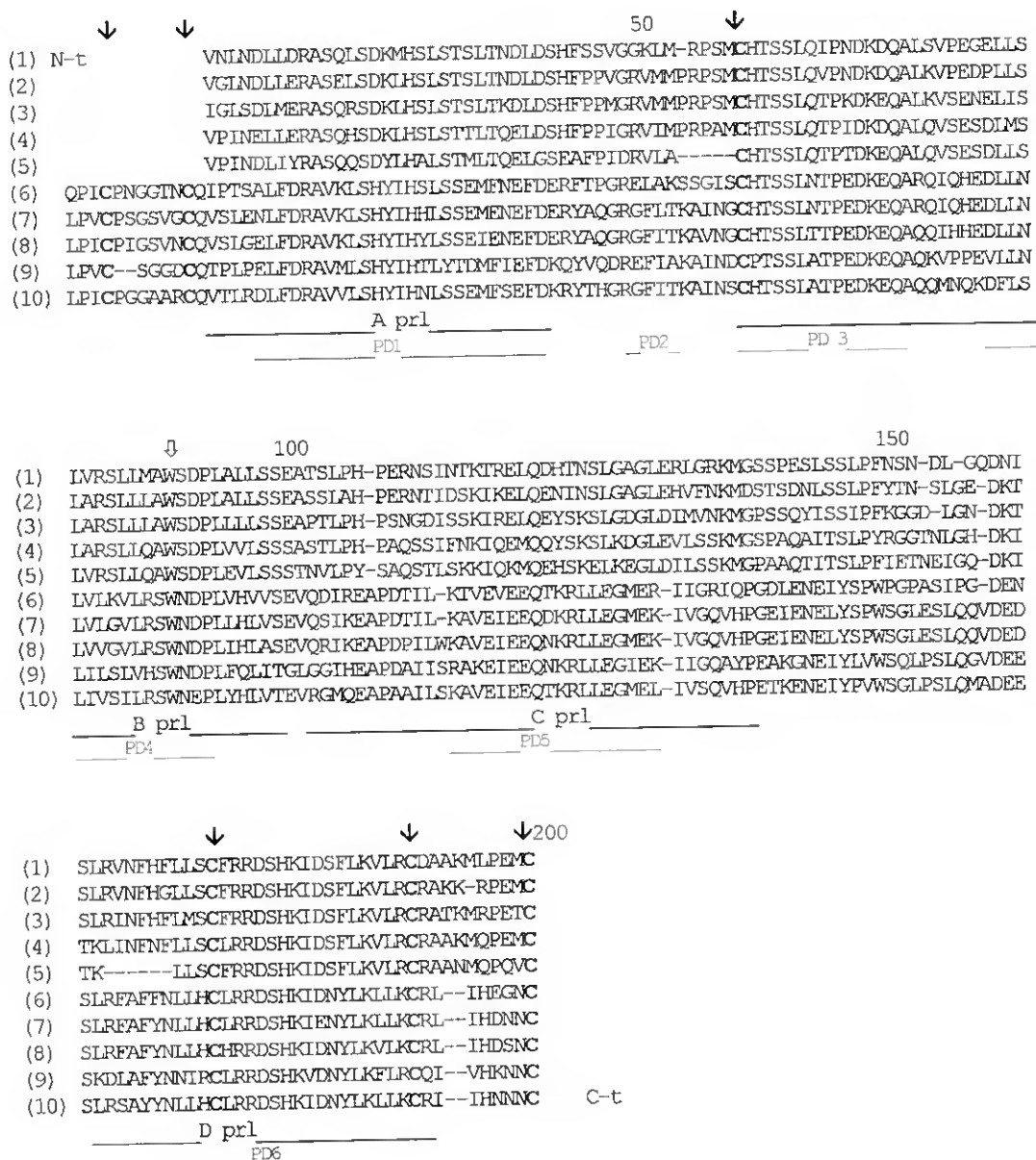


Figura 5 - Alinhamento de PRL de alguns animais. (1)-peixe-gato, (2)-carpa, (3)-"chum salmon", (4)-tilápia 24K, (5)-tilápia 20K, (6)-rã-touro, (7)-tartaruga-marinha, (8)-galinha, (9)-rato, (10)-homem. De notar o igual posicionamento dos resíduos de cisteína, em negrito e assinaladas por setas, (↓); e a ausência dos 12 primeiros aminoácidos nas PRLs de peixes, seqüências de (1) a (5), em relação às de tetrápodes, seqüências de (6) a (10). As regiões de A a D e de PD1 a PD6 referem-se a regiões conservadas, segundo diferentes autores. Foram criados espaços em algumas seqüências de forma a aumentar o grau de homologia. A seta larga, (⇓), indica o triptofano no locus 91, característico da PRL. (N-t: Terminal amina, C-t: Terminal carboxílico) (Adaptado de Yasuda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, in Fish Physiology, Vol. XIII, 1994)

Nos tetrápodes as pontes bissulfito formam-se entre os seguintes pares de resíduos de cisteínas: 4/11, 58/175 e 192/202, enquanto que nos peixes só se formam as pontes bissulfito referentes aos dois últimos pares devido à ausência dos 12 primeiros aminoácidos. Não há unanimidade na determinação das regiões conservadas. Segundo Yasuda *et al.*, elas seriam seis, tal como se representa na Figura 5 por PD1 a PD6. Mas de acordo com Thomas T. Chen *et al.*, as regiões conservadas seriam apenas as quatro referenciadas por A, B C e D. Comparando as duas situações observamos uma quase coincidência entre PD1 e A, e PD6 e D. De acordo com os últimos autores, a região PD2 não é considerada sendo as regiões PD3 e PD4 englobadas em B, e a região C maior que PD5.

A versatilidade fisiológica da PRL torna difícil relacionar a sua estrutura com os domínios activos da proteína nativa, no entanto estudos feitos com GH e PRL humanas parecem indicar que resíduos de aminoácidos das regiões PD1 e PD4 têm função lactogénica e que resíduos das regiões PD1, PD3 e junto a PD6, têm a função de ligação ao receptor, (Yasuda *et al.*, 1991).

A percentagem de homologia entre as PRL de peixes é muito variável. Entre duas espécies do mesmo género, como por exemplo entre carpa de prata e carpa de cabeça grande, o grau de homologia é de 99.4%. Entre três espécies da família Salmonidae: “chum salmon”, salmão chinês e truta arco-íris, é de 98% ou superior. No entanto quando se comparam espécies de diferentes famílias, a percentagem desce para valores entre os 64 a 74%, e ao compararmos a PRL de peixes com a de tetrápodes, encontram-se homologias da ordem dos 28-35%, (*in* Chang, Y. S. *et al.*, 1992; Noso, T., *et al.*, 1992).

### 3.1-Funções da PRL

Actualmente sabe-se que a PRL tem várias acções nos vertebrados, nomeadamente: função no crescimento, desenvolvimento e reprodução; função osmorregulante e acção lactogénica, esta, apenas nos mamíferos. Nestes animais conhecem-se várias formas bioactivas de PRL, que podem ser o resultado de regulação pós-tradução, (Ellis, *et al.*, 1995). Tem também função imunológica pois células do

sistema imunitário, de homem e rato, expressam o seu receptor que apresenta alta afinidade para a hormona, (Darlene, M., *et al.*, 1994).

Nos peixes a PRL exerce efeitos em várias funções nomeadamente: osmorregulação, reprodução, comportamento e metabolismo, (Clarke and Bern, 1980, *in* Chang, Y. S. *et al.*, 1992; Prack, M. 1980). Nos teleósteos a sua secreção está limitada à região RPD, (*rostral pars distalis*) da adenohipófise (Nishioka, *et al.*, 1993), sendo a sua principal função o controlo hidromineral nos teleósteos eurihalinos, (Hirano, 1986), verifica-se que *Poecilia latipinna*, teleósteo de água doce, segrega seis vezes mais PRL do que teleósteos de água salgada.

Um meio externo hiposmótico estimula as células da PRL, que actuando em vários órgãos alvo: brânquias, (Ogawa, *et al.*, 1973), rins, bexiga urinária, e intestino, (Morley, M. 1981, Utida, *et al.*, 1972), conduz à manutenção da concentração interna de iões sódio pela acção de diferentes mecanismos:

- a) redução da permeabilidade das brânquias ao efluxo de sódio, (controlo da APTase-Sódio,Potássio), e ao influxo de água;
- b) aumento da reabsorção de sódio nos néfrons;
- c) estimulação, no epitélio renal, da formação de grandes e numerosos glomérulos de Malpighy, o que conduz à produção de urina abundante e muito hiposmótica, (Hirano, 1986; Wendelaar Bonga and Pang, 1991 *in* Physiology of Fishes).

A importância da pituitária varia consideravelmente entre os peixes, desde a morte dos hipofisectomizados, de água doce, que pode ser prevenida pela administração de PRL, até aos peixes de água salgada que morrem perante PRL injectada. Nestes últimos a acção da PRL é desconhecida e o seu nível plasmático é muito inferior aos peixes de água doce, (Wendelaar-Bonga (1993), *in* The Physiology of Fishes). Em salmonídeos os estudos têm-se centrado na acção da PRL na osmorregulação, sendo pouco conhecida outras suas acções, ainda que o seu nível plasmático aumente em situação de “stress”, por confinamento, (Prunet *et al.*, 1990).

No que respeita à reprodução, tem acção nas glândulas mucosas da pele de certos teleósteos levando à produção de muco que serve de alimento aos recém-nascidos e que controla o comportamento durante a reprodução, nomeadamente: construção de locais para a postura e incubação dos ovos dentro da cavidade bucal, (Chester-Jones *et al.*, 1987).

#### 4-A Hormona do Crescimento (GH)

Desde os anos 20, tendo como base experiências em ratos, que se conhece a acção promotora do crescimento da GH. Actualmente é conhecida a sua sequência em vários animais, revelando-se uma proteína com peso molecular variando entre os 21-23 KDa, duas pontes bissulfito e uma só molécula de triptofano na posição 85, Figura 6.

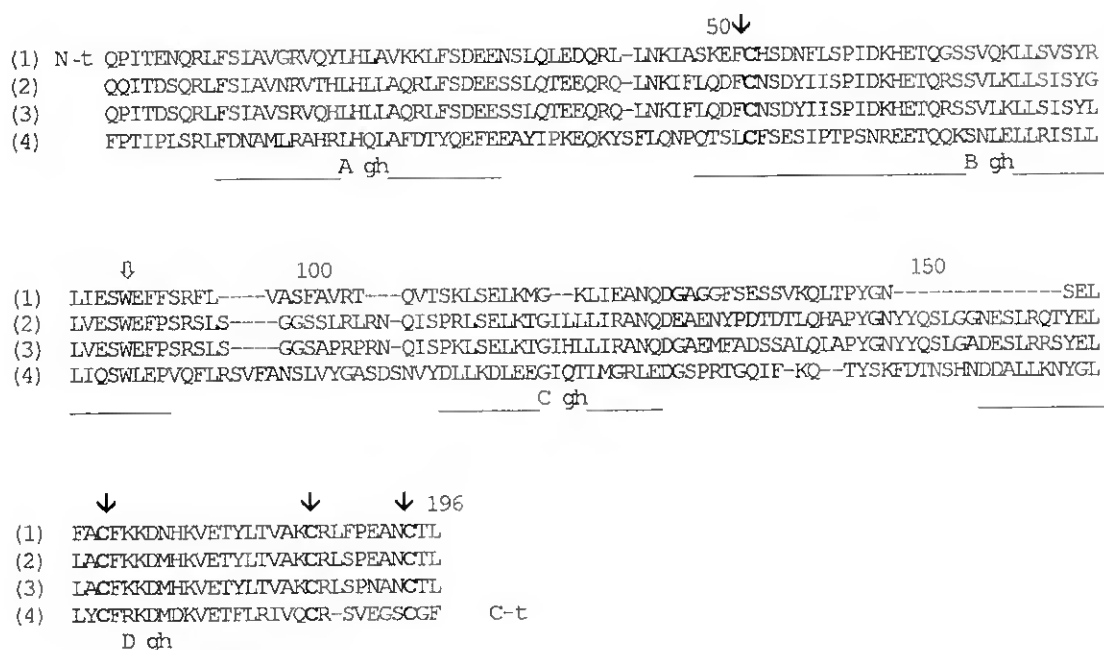


Figura 6 - Estrutura primária de GH de: (1)-linguado, (2)-tilápia, (3)-atum, (4)-homem. Os resíduos de cisteína, (Cys), estão em negrito e indicados por setas, (↓). As pontes bissulfito são estabelecidas pelos resíduos de Cys 54/169 e 186/194. A seta larga, (↯), indica o triptofano tipicamente no locus 85. Tal como em PRL encontram-se 4 regiões conservadas. Os espaços criados têm a função de aumentar o grau de homologia. (N-t: Terminal anina, C-t: Terminal carboxílico). (Adaptado de Chen, *et al.*, in Fish Physiology, Vol. XIII, 1994)

Tal como a PRL, a GH apresenta quatro regiões conservadas, A, B, C e D, e quatro cisteínas responsáveis pelas duas pontes bissulfito com localização semelhante às de PRL de peixes. Em relação à localização do resíduo de triptofano, na GH, ele ocupa a posição 85, Figura 7.

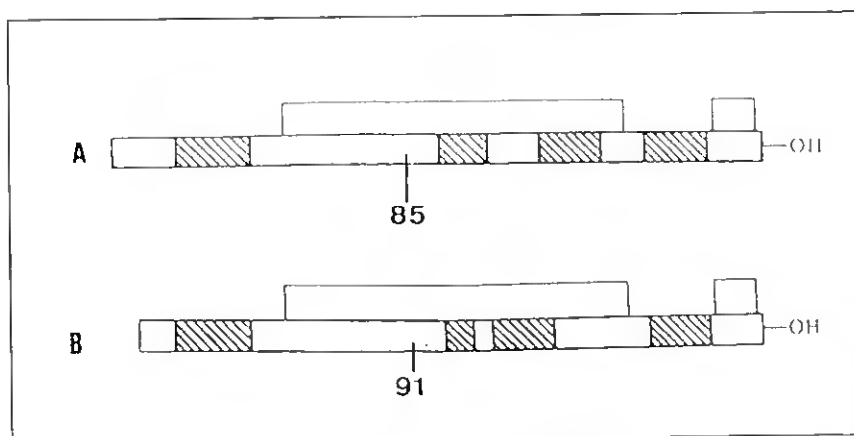


Figura 7 - Representação esquemática da GH de tetrápodes. (A), e PRL de peixes, (B). Os arcos indicam as pontes bissulfito, duas em ambas as moléculas. Nos dois esquemas estão referenciadas a posição do resíduo de triptofano: *locus* 85 na GH e 91 na PRL. (Adaptado de Bentley, 1982)

#### 4.1-Funções da GH

Enquanto a PRL apresenta diferentes funções nas diversas classes de vertebrados, a GH na maior parte dos vertebrados está envolvida, principalmente, na regulação do crescimento somático pós-natal e na manutenção do metabolismo do azoto, lípidos, glúcidos e sais minerais, (Bentley, 1992). A GH tem acção no aumento da permeabilidade das células aos aminoácidos e estimula a síntese proteica, aspecto com importância na mitogénese. Nos vertebrados a hipofisectomia resulta numa drástica redução do crescimento, que pode ser corrigida pela administração de GH exógena, (Rentier-Delrue, F.,1989). Através das somatomedinas, que estão presentes no plasma de todos os vertebrados excepto nos teleósteos , cuja produção promove no fígado, estimula o crescimento dos ossos. Também no fígado, do homem, a GH regula a expressão dos receptores da PRL,.(Scharfmann, 1994). Nos peixes é bem conhecida a sua acção estimuladora do crescimento somático, no desenvolvimento/morfogénese e na osmorregulação, favorecendo a adaptação dos peixes à água salgada sendo a sua acção diferenciada da PRL, (Bolton *et al.*, 1987).



O alinhamento entre várias SLs não necessita da introdução de deleções para maximizar a homologia. Esta observação parece indicar que há uma grande conservação nesta hormona, desconhecendo-se ainda o seu significado, (Chen *et al.*, 1994, in Fish Physiology, Vol. XIII).

### 5.1- Funções da somatolactina

Sendo a SL uma hormona recentemente descoberta, ainda se sabe pouco sobre as suas funções e desconhecem-se os seus órgãos alvo.

Nos peixes as células produtoras de somatolactina respondem a diversos estímulos ambientais: baixa concentração de cálcio na água, tendo a SL uma função hipercalcemiante, (Olivereau *et al.* (1981); Kakizawa *et al.* 1993); baixos pH e salinidade da água, (Wendelaar-Bonga *et al.*, 1986, in Kakizawa *et al.*, 1993); intensidade luminosa: a concentração plasmática de SL aumenta em *Sciaenops ocellatus* e *Micropogonias undulatus* quando expostos a ambientes escuros. Os mesmos autores não encontraram variação no nível plasmático de SL quando sujeitaram os peixes a situações de “stress”: aprisionamento em pequenos espaços, exposição ao ar e acção de anestésias, (Zhu and Thomas, 1995). O nível plasmático, sendo superior nos adultos em relação aos juvenis na truta arco-íris aumenta acentuadamente, durante o crescimento das gónadas, (Evans, 1993; Rand-Weaver, *et al.* 1995).

### **6-Breve comparação entre os cDNAs de PRL, GH e SL**

A homologia entre as hormonas PRL, GH e SL é baixa, em média 24%, (Ono, 1994, in Fish Physiology). Apesar disto, o seu alinhamento, Figura 9, revela que elas estão estruturalmente relacionadas. Quatro resíduos de cisteínas, (Cys), encontram-se em posição semelhante nas três proteínas, (Ono 1994, in Fish Physiology, Vol. XIII).



## 7-Objectivos

A evolução do mundo vivo tem sido feita, simultaneamente, com manutenção de constância genética e com a introdução de variabilidade genética. A variabilidade é consequência de diversos mecanismos, nomeadamente mutações, a verdadeira base da evolução, (Stickberger, 1990).

A determinação de filogenias, com base em estudos moleculares, recorrem a uma grande variedade de técnicas que, desde as imunológicas à sequenciação de proteínas e de ácidos nucleicos são, actualmente, poderosos métodos de trabalho.

Admitindo que, o genótipo precede o fenótipo, um método artificial mas preciso, de construção de cladogramas, consiste na comparação de sequências de DNA, de várias espécies, em relação à mesma proteína. Esta metodologia oferece as vantagens de determinar as substituições nucleotídicas sinónomas (devido à degenerescência do código genético), ou não sinónomas, nas regiões codificantes e não codificantes, e permite, ainda, comparar as regiões codificantes e não codificantes entre diferentes espécies (Li *et al.*, 1991). No caso da determinação do grau de similitude entre a sequência de nucleótidos ser feita a partir de cDNA (DNA complementar ao RNAmensageiro), só é possível comparar os exões, ou seja, as regiões do DNA que correspondem à proteína.

Em relação à hormona prolactina de peixes, poucas sequências de cDNA estão publicadas. Da prolactina de dourada são desconhecidas as sequências quer da proteína quer do cDNA. Por isso, o objectivo deste trabalho foi a determinação da sequência génica codificante da hormona PRL de dourada, (*Sparus aurata*).

**PARTE I**

---

## PARTE I - Produção de uma sonda homóloga para detecção do cDNA da hormona Prolactina

### A-INTRODUÇÃO

A análise comparativa da sequência dos aminoácidos de proteínas pertencentes à mesma família revela regiões conservadas, ou seja, nestas regiões a sequência de aminoácidos é igual ou, quase igual. Também os genes, de diferentes espécies que codificam proteínas com igual função, apresentam regiões conservadas, tal como se mostra na Figura I-1, ao alinhar o cDNA e respectiva dedução da proteína madura de PRL, de carpa e de robalo.

```

100
CARPA 5' GTC GGT CTG AAT GAT TTA CTG GAA AGA GCC TCT CAA CTT TCA GAC AAA
      V  G  L  N  D  L  L  E  R  A  S  Q  L  S  D  K
      72
ROBALO 5' ATC CCC ATC TCT GAC CTG CTG GAC CGA GCC TCC CAG CGC TCT GAC ACA
      I  P  I  S  D  L  L  D  R  A  S  Q  R  S  D  T

CTT CAC TCC CTC AGC ACC TCT CTC ACC AAT GAC CTG GAT TCT CAC TTT CCT CCT GTT
L  H  S  L  S  T  S  L  T  N  D  L  D  S  H  F  P  P  V

CTG CAC TCC CTC AGC ACG ACG ATC ACC CAG GAC CTG CAC TCT CAT TTC CCT CCG ATG
L  H  S  L  S  T  T  L  T  Q  D  L  D  S  H  F  P  P  M

GGG AGG GTA ATG ATG CCC CGT CCG TCG ATG TGC CAC ACA TCC TCC CTT CAA ATT CCC
G  R  V  M  M  P  R  P  S  M  C  H  T  S  S  L  Q  I  P

GGC CGG GTG ATC ACG CCC CGC CCT TCA ATG TGC CAC ACC TCC TCT CTA CAT ACG CCC
G  R  V  I  T  P  R  P  S  M  C  H  T  S  S  L  H  T  P

AAT GAC AAA GAC CAA GCC CTG AAA GTG CCG GAG GAT GAG TTA CTT TCT TTG GCT CGG
N  D  K  D  Q  A  L  K  V  P  E  D  E  L  L  S  L  A  R

ATT GAC AAG GAG CAA GCT CTC CAA GTA TCA GAG GCA GAC CTG TTG TCA TTG GTT CGC
I  D  K  E  Q  A  L  Q  V  S  E  A  D  L  L  S  L  V  R

TCT CTG CTG CTG GCG TGG TCC GAT CCC CTG GCC CTC CTC TCC TCT GAG GCG TCC AGC
S  L  L  L  A  W  S  D  P  L  A  L  L  S  S  E  A  S  S

TCC CTG CTC CAA GCC TGG CGA GAC CCC CTT GTA ATC CTT TCC ACC TCT GCT AAC ACC
S  L  L  Q  A  W  R  D  P  L  V  I  L  S  T  S  A  N  T

CTG GCA CAT CCA GAA CGC AAC ACC ATT AAC AGC AAG ACC AAA GAA CTG CAA GAC AAC
L  A  H  P  E  R  N  T  I  N  S  K  T  K  G  L  Q  D  N

TTA CCT CAC CCG GCC CAA AAC AGC ATA TCC ACC AAA GTC CAG GAG CTG CTG GAG CAT
L  P  H  P  A  Q  N  S  I  S  T  K  V  Q  E  L  L  E  H

```

```

ATC AAC AGC CTG GGT GCA GGT CGT GAG CGT GTC GTT CAC AAG ATG GGC TCA TCA TCA
I  N  S  L  G  A  G  L  E  R  V  V  H  K  M  G  S  S  S
ACC AAA AGC CTG GGA GAT GGC CTG GAT ATA TTA TCT GGC AAG TTT GGT CCA GCA GCT
T  K  S  L  G  D  G  L  D  I  L  S  G  K  F  G  P  A  A

GAC AAC CTG TCC TCT CTC CCT TTT TAC AGC AAC AGC CTT GGC CAG GAT AAA ACC TCT
D  N  L  S  S  L  P  F  Y  S  N  S  L  G  Q  D  K  T  S
CAG TCC ATC TCC TCA CTG CCC TAC AGA GGA GGC AAT GAC ATC AGC CAG GAC AGG ATT
Q  S  I  S  S  L  P  Y  R  G  G  N  D  I  S  Q  D  R  I

CGA CTT GTC AAT TTC CAT TTT CTG TTG TCC TGC .-. TTC CGC AGG GAC TCC CAC AAA
R  L  V  N  F  H  F  L  L  S  C  ...  F  R  R  D  S  H  K
TCC AGA CTA ACC AAC TTC CAC TTC TTG ATG TCC TGC TTC CGC CGG GAC TCC CAC AAG
S  R  L  T  N  F  H  F  L  M  S  C  F  R  R  D  S  H  K

ATT GAC AGT TTC CTC AAA GTT CTG CGC TGC CGG GCA GCC AAG AAG AGA CCY GAG ATG
I  D  S  F  L  K  V  L  R  C  R  A  A  K  K  R  P  E  M
ATT GAC AGC TTC CTG AAG GTC CTC CGC TGC CGG GCA GCA AAA TTC CAA CCT GAG ATG
I  D  S  F  L  K  V  L  R  C  R  A  A  K  L  Q  P  E  M

TGC
-C
TCG 3'
C

```

Figura I-1 - Alinhamento entre as duas regiões codificantes de cDNA, e respectivos aminoácidos, no código de uma letra, de PRL de carpa. (Chang, *et al.* 1992) e de robalo, (Doliana, *et al.*, 1994). A numeração, na região 5', refere-se ao cDNA. Os aminoácidos comuns, nas duas proteínas, encontram-se sublinhados. A deleção introduzida na sequência de PRL de carpa permite aumentar a homologia

Com base nesta observação, consequência da evolução divergente, é possível construir *primers*, específicos para a amplificação de determinada zona de DNA ou cDNA. Os *primers* a determinar poderão ser homólogos, se forem delineados a partir da própria sequência, de DNA ou cDNA, que se pretende amplificar, (Peters, 1993).

No caso do presente trabalho, e porque não era ainda conhecida a sequência do cDNA da PRL de dourada, procedemos à determinação da sequência de dois *primers* heterólogos, pois basearam-se em sequências de cDNA e de aminoácidos de PRL de outros peixes teleósteos. Estes *primers* heterólogos (directo e reverso) serviram para, através de PCR, amplificarmos parte do cDNA da PRL de dourada, obtendo-se deste modo um fragmento de cDNAs codificante de PRL.

## B-MÉTODOS

### I-Determinação da sequência dos *primers*

Para esta determinação seguiram-se os critérios propostos por Clackson, T. *et al* (1993); Compton, T. (1990); Newton, C. R. (1995). A metodologia seguida obedeceu a três etapas.

1ª - A comparação da sequência de aminoácidos da hormona PRL em vários peixes e vários tetrápodes revela 6 domínios altamente conservados, que Yasuda *et al* (1991) denominaram por PD, (descrição no ponto 3 da Introdução). Segue-se a representação de parte de PD3 e de parte PD6 em relação a duas espécies de carpa, carpa de prata, (*Hypophthalmichthys molitrix*) e carpa de cabeça grande (*H. nobilis*), (Chang, *et al*, 1992); uma espécie de robalo, *Dicentrarchus labrax*, (Doliana, *et al*, 1994); uma espécie de Tilápia (*Oreochromis mossambicus*) isoforma 188 (Doliana, *et al* 1994) e salmão (*Oncorhynchus keta*) (Yasuda *et al* 1986 in Yasuda *et al* 1991), Fig I 2.

PD3	PD6
65	181
I - ...HTPIDKEQAL.....	DSHKIDSFLKVL...
II - ...QIPMDKDQAL.....	DSHKIDSFLKVL...
III - ...QIPMDKDQAL.....	DSHKIDSFLKVL...
IV - ...QTPIDKDQAL.....	DSHKIDSFLKVL...
V - ...QTPIDKEQAL.....	DSHKIDSFKKVL...

Figura I-2 - Sequência de alguns aminoácidos das regiões conservadas PD3 e PD6 em, I-Robalo, II-Carpa de cabeça grande, III-Carpa de prata, IV-Tilápia 24k e V-Salmão. A numeração dos aminoácidos refere-se ao robalo. Os aminoácidos coincidentes estão a negrito.

2ª - Compararam-se as sequências do cDNA de PRL de *Hypophthalmichthys molitrix*, *H. nobilis* e *Dicentrarchus labrax* das referidas regiões PD3 e PD6, Figura I-3.

#### PD3

I- 5' CAT ACG CCC ATT GAC AAG GAG CAA GCT CTG 3'  
 II- 5' CAA ATT CCC AAT GAC AAA GAC CAA GCC CTG 3'

#### PD6

I- 5' GAC TCC CAC AAG ATT GAC AGC TTC CTG AAG GTC CTC 3'  
 II- 5' GAC TCC CAC AAA ATT GAC AGT TTC CTC AAA GTT CTG 3'

Figura I-3 - Alinhamento de parte de PD3 e de PD6 do cDNA de I-robalo e II-carpa de prata. (a sequência de carpa de cabeça grande é igual à de carpa de prata. nestas duas regiões). A negrito estão ao nucleótidos coincidentes.

3ª - Sendo o código genético degenerado, existe uma relação de preferência entre cada aminoácido e um, ou mais, dos codões que o codificam. Este aspecto é muito importante para o delineamento de *primers* degenerados. Por isso verificamos a relação percentual com que cada aminoácido é expresso, (excepto metionina e triptofano), em relação aos respectivos codões para *Sparus aurata*. Para estabelecermos esta relação usamos uma base de dados de proteínas de *Sparus aurata* e obtivemos através da EMBO outras sequências de proteínas da mesma espécie. Verificamos, nomeadamente que nesta espécie o aminoácido Serina apresenta em relação aos seus codões os valores percentuais expressos na tabela I-1.

Codão	%
TCC	23
AGT	8
TCT	40
TCA	10
AGC	10
TCG	9

Tabela I-1 - Relação percentual da expressão dos codões do aminoácido serina. Verifica-se que o codão para a expressão da serina é o TCT, i.e. 40% dos aminoácidos serina presentes numa proteína de *Sparus aurata* foram codificados por aquele codão.

A sequência de aminoácidos da hormona de crescimento (GH) do robalo, deduzida a partir do respectivo cDNA revela um alto grau de homologia com a de outros peixes teleósteos, filogeneticamente próximos. O mesmo se verifica em relação à PRL. Também já foi mostrada conservação entre GH e PRL pois são hormonas da mesma família. Entre o robalo e a dourada o grau de homologia, da GH, foi avaliado em 92% (Doliana *et al* 1992). Tendo como base este alto valor de homologia entre a GH das duas espécies e o facto de GH e PRL serem hormonas da mesma família, assumimos que o grau de homologia entre as respectivas PRL seria, também, elevado. Usamos, por isso, a sequência da hormona PRL de robalo (Doliana *et al* 1994), como principal base de trabalho para a determinação da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores heterólogos (*primers*).

### 1.1-Primers

A sequência dos *primers*, P1 (*primer* directo) determinada a partir da região sublinhada de PD3, e P2 (*primer* reverso) determinado a partir da zona sublinhada de PD6, está representada na Figura. I-4

#### PD3 de robalo

5' CAT ACG CCC ATT GAC AAG GAG CAA GCT CTG 3'

**P1-** 5' CCC ATC GAC AAG GAR CA 3'

#### PD6 de robalo

5' GAC TCC CAC AAG ATT GAC AGC TTC CTG AAG GTC CTC 3'

**P2 -** 5' TT CAG GAA GCT GTC AAT CTT GTG 3'

Figura I-4 - Sequência dos *primers* P1 (*primer* directo) e P2 (*primer* reverso). No *primer* degenerado, P1, a letra R representa os nucleotídeos G e A, na relação 1:1.

Os *primers* foram analisados no programa OLIGO-Version-3.4 para, nomeadamente, verificação da sua auto e hetero dimerização e amplificação, e

temperatura de desnaturação. P1 e P2 delimitam uma região de 361bp e a sua construção foi encomendada a Pharmacia Biotech.

## 2-Extracção de RNAtotal

A extracção do RNAtotal, (RNAt), foi feita segundo o método de Chomczynski e Sacchi (1987), modificado.

As douradas, na sua maioria com uma idade de cerca de 2 anos, foram mortas por decapitação e as pituitárias, retiradas de imediato utilizando material estéril, foram congeladas em azoto líquido e posteriormente conservadas a 80°C negativos.

Para a extracção do RNAt, as pituitárias foram homogeneizadas em solução D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 0.75M, sarcosil 10%) suplementada com 2β-mercaptoetanol (72μl/10ml de solução D). Ao homogenato foram adicionados acetato de sódio 2M, fenol saturado em água Depc estéril e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após agitação e repouso em gelo centrifugou-se a 10000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo o RNA, foi retirado para novos tubos estéreis e adicionou-se igual volume de isopropanol. Esta mistura foi deixada a precipitar, a -20°C, durante a noite. Para concentrar o RNA, foi feita uma centrifugação por 30 minutos a 10000g a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado por três vezes com etanol/água Depc (75:25), fazendo-se, após cada lavagem, centrifugações a 10000g, por 15 minutos a 4°C. O *pellet* obtido, após evaporação do álcool, foi ressuscitado em 100μl de água Depc. O RNA foi quantificado num espectrofotómetro (Pharmacia GeneQuant) A sua qualidade e grau de pureza, foi avaliada por electroforese em gel de agarose (1%) feito com tampão TBE 1x suplementado com Brometo de etídio. O Brometo de etídio apresenta fluorescência sob luz ultra-violeta, assim e porque ele se liga aos ácidos nucleicos, estes tornam-se visíveis quando iluminados com luz ultra-violeta. O tampão dos eléctrodos foi também TBE 1x. Após a electroforese o RNA foi visualizado num transiluminador sob luz ultra-violeta.

As amostras de RNA foram conservadas a -80°C até posterior utilização.

### 3-Síntese de cDNA

Neste processo o RNAmensageiro (RNAm) serve de molde à síntese de DNA que, por ficar com uma sequência complementar ao RNAm se denomina DNAcomplementar (cDNA). Esta conversão de informação, de uma molécula de RNA para uma de DNA, depende da acção enzimática da transcriptase inversa (RT), enzima encontrada nos Retrovírus, (Sambrook, *et al.*, 1989). A RT para iniciar este processo necessita de uma região de dupla cadeia, pelo que são utilizados *primers* de timina que hibridizam por complementaridade ao poli(A) da região 3' do RNAm.

Para a síntese do cDNA foram usados 4µg de RNAt. À amostra de RNAt foi adicionada água estéril de modo a que após a adição dos diferentes reagentes se obtivesse um volume final de 30µl. O RNA foi desnaturado a 70°C durante 3 minutos e após arrefecimento em gelo adicionaram-se: 3µl de oligo(dT) (15pmol/µl), 1.5µl de dNTPs (10mM) em água Depc, 6µl de Tampão da enzima RT 5x concentrado, 1µl de RNAsin (concentrado) e 1µl de RT (concentrada), todos da marca Pharmacia. Foi feito um controlo negativo, em que o RNAt foi substituído por água Depc.

Após breve agitação os tubos foram postos a incubar durante 90 minutos a 42°C. Terminada a síntese, a enzima foi desnaturada por aquecimento: 65°C durante 5 minutos.

### 4- Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

O método PCR baseia-se na capacidade da DNAPolimerase (DNAP) catalisar o crescimento de pequenos oligonucleotídeos já hibridizados com uma molécula de DNA de cadeia simples, ou de cDNA, descoberta feita na década de 60. Esta técnica, realizada *in vitro*, permite obter em poucas horas um número de cópias, de qualquer sequência de DNA seleccionada, na ordem de  $10^5$ . Uma característica importante do PCR é que, o segmento de DNA que se pretende amplificar, não necessita de estar separado do

restante DNA, uma vez que a região amplificada depende da especificidade dos *primers* utilizados.

Este procedimento exige, entre outros, os seguintes aspectos básicos:

- A DNAPolimerase utilizada terá que ser termoestável, pois terá que suportar temperaturas da ordem dos 95°C, pelo que usamos a Taq DNAPolimerase, derivada de uma espécie termófila, a *Thermus aquaticus*;

- Dois polinucleotídeos sintéticos - *primers*, em que, a sequência das suas bases será complementar a regiões localizadas em cadeias de DNA opostas ficando a região alvo, que se pretende amplificar, entre os dois *primers*.

O processo típico de PCR envolve 25 a 30 ciclos de amplificação, apresentando cada ciclo três etapas sucessivas:

1ª-Desnaturação do cDNA;

2ª-“Annealing”, ligação dos *primers* ao cDNA;

3ª-Crescimento dos *primers*, i.e., crescimento de novas cadeias de DNA a partir dos *primers* no sentido de 5' para 3'. A presença dos *primers* é um dos aspectos de maior importância, nesta técnica. Porque são eles que delimitam a região do cDNA a amplificar e a DNAP só inicia a replicação do DNA de cadeia simples a partir de uma região de dupla cadeia.

As condições do PCR em que foram utilizados os *primers* P1 e P2, específicos para o cDNA de PRL de dourada, estão sintetizadas na tabela I-2, sendo a única variável a quantidade de *primers*.

Tubo	cDNA	Tampão	MgCl <sub>2</sub> 50mM	P1 50pmol/μl	P2 50pmol/μl	dNTPs 10mM	Enzima TAQ	H <sub>2</sub> O estéril
1	5μl	5μl	2.5μl	2μl	2μl	1μl	0.2μl	32.3μl
2	5μl	5μl	2.5μl	1μl	1μl	1μl	0.2μl	32.3μl
3	-----	5μl	2.5μl	1μl	1μl	1μl	0.2μl	37.3μl
4	-----	5μl	2.5μl	1μl	1μl	1μl	0.2μl	37.3μl

Tabela I-2. - Nos tubos 1 e 2, esperamos a amplificação da região delimitada pelos *primers* P1 e P2. Os tubos 3 e 4 são tubos controlo.

Foram feitos dois controlos negativos; um em que o cDNA foi substituído por água (tubo 3), e outro em que o cDNA foi substituído pelo controlo negativo da síntese do cDNA (tubo 4). A solução tampão, a enzima e os desoxinucleotídeos eram da marca Pharmacia. O ciclo térmico, feito num termociclador Hybaid Omnigene, foi o seguinte:

- Desnaturação - 94°C, durante 15 segundos
- “Annealing” - 53°C, durante 1 minuto
- Crescimento dos *primers* - 72°C, durante 1 minuto

Fizeram-se 30 ciclos de amplificação. Antes do primeiro ciclo foi feita uma desnaturação a 94°C durante 30 segundos e após o último ciclo o crescimento dos *primers* foi feita durante 5 minutos. O resultado deste PCR foi avaliado através de electroforese em gel de agarose.

### **5-Avaliação dos produtos de PCR em gel de agarose**

Os produtos do PCR anterior foram electroforizados em gel de agarose 1%, feito com tampão TAE 1x, suplementado com brometo de etídio. Electroforizamos 5µl de cada amostra, (amostras dos tubos de 1 a 4 referidos na tabela I-2). A cada amostra adicionamos 3µl de solução “loading buffer” (solução de sacarose a 45% corada com azul de bromofenol), de modo a criar densidade na amostra. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1KB DNA Ladder (Gibco BRL). Foi escolhido este marcador porque os *primers* construídos amplificavam uma região de 361bp e, neste marcador os fragmentos que nos confirmavam a presença de produtos de PCR com aquele valor eram de fácil visualização. O tampão dos electrodos foi TAE 1x e o campo eléctrico a que as amostras foram submetidas foi de 120V.

### 5.1-Excisão e purificação da banda pretendida

Para a excisão da banda, teoricamente esperada, electroforizamos uma amostra de 40µl do tubo 1 do PCR, suplementada com 10µl de “loading buffer”. O gel de agarose utilizado, neste caso, foi de 0.8% sendo todos os outros procedimentos e parâmetros iguais à electroforese descrita na etapa anterior.

A banda com o tamanho esperado foi excisada, sob luz ultra-violeta, e o DNA purificado com o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

À banda excisada adicionou-se o triplo (em ml) do seu peso (em gramas), de QX1 Buffer. Seguiu-se uma incubação de 10min. a 50°C de forma a fundir o gel de agarose. A amostra foi colocada numa coluna do “kit” e centrifugada. Durante esta centrifugação apenas o DNA ficou adsorvido à membrana de sílica-gel da coluna, sendo os restantes produtos eliminados. Seguiu-se uma centrifugação com 750µl de Buffer PE que eliminou os contaminantes não eluídos durante a primeira centrifugação. Foi feita a secagem da coluna por nova centrifugação e o DNA foi eluído com 50µl de água estéril por centrifugação. Todas as centrifugações referidas neste processo foram feitas durante 60segundos a 12000rpm.

Após a purificação do DNA, cerca de 5µl foram electroforizados em gel de agarose de forma a avaliar qualitativamente o método utilizado.

## 6-Clonagem

A clonagem do produto de PCR foi feita no vector pGEM -T (Promega), sistema que está optimizado para a clonagem de produtos de PCR, pois as suas terminações “overhang”, terminam por timinas. Na Figura I-5 representa-se o local de clonagem deste vector.



Para este procedimento, as células, 20µl de um “stock” em glicerol, foram crescidas com agitação em 2ml de LB durante 14 horas a 37°C. Após este crescimento, foram pipetados 50µl para 9ml de novo LB e as células foram deixadas crescer por apenas 2 horas nas condições referidas anteriormente, de forma a atingirem a fase de crescimento exponencial. De seguida, procedeu-se à centrifugação das células durante 5min. a 3000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram tornadas competentes com CaCl<sub>2</sub> 50mM. Para a transformação adicionaram-se 10µl do vector clonado a 200µl de células competentes. Sujeitou-se esta mistura a 35min. de incubação em gelo, após o que se aplicou um choque térmico de 42°C durante 2min. As células, assim transformadas, foram plaqueadas em LB agar suplementado com ampicilina numa concentração final de 50µg/ml. As caixas de Petri foram colocadas numa estufa a 37,5°C durante 14-16 horas, permitindo assim o crescimento das células que sofreram transformação, pois só essas apresentam resistência à ampicilina, uma vez que o vector contém um gene que confere essa resistência. A selecção dos clones, que estando transformados, apresentam “insert” no vector foi feita através do tamanho das colónias. A inserção do fragmento de DNA no plasmídeo desativa o gene da β-galactosidase, o que implica maior reprodução das células, assim sendo, as colónias cujos DNA estão clonados são maiores, cerca de 1mm de diâmetro.

Para o crescimento de clones positivos, foram repicadas 6 colónias positivas e isoladas, para tubos contendo 2ml de LB, suplementado com o mesmo antibiótico e na mesma concentração referido para o seu crescimento nas placas de Petri. Após o crescimento das células, que ocorreu a 37°C com agitação durante 8-10 horas, procedeu-se à purificação dos plasmídeos, para posterior confirmação da clonagem.

## **7-Confirmação da clonagem**

Para confirmarmos a eficácia da clonagem procedemos ao isolamento dos plasmídeos, seguida de digestão com enzimas de restrição e de electroforese em gel de agarose. Este procedimento permitiu-nos observar os fragmentos resultantes da digestão, tornando-se possível a verificação da presença do *insert*.

O isolamento dos plasmídeos foi feito com Wizard Minipreps (Promega), tendo a metodologia obedecido às instruções do fabricante. Cerca 1,5ml de cada clone crescido (conforme referido no ponto anterior) foi centrifugado (2min., 12000rpm) e as células sedimentadas, após se descartar o sobrenadante, foram ressuspendidas, lisadas e o lisado neutralizado, utilizando para cada uma destas etapas soluções específicas integrantes do “kit”. A mistura, assim obtida, foi agitada e centrifugada durante 5min. a 12000rpm com o objectivo de obtermos um sobrenadante contendo apenas os plasmídeos. Todas as outras fracções ao sedimentarem tornaram-se descartáveis. Ao sobrenadante, pipetado para novo tubo “eppendorf”, foi adicionada resina de purificação, à qual os plasmídeos se ligaram. A mistura plasmídeo/resina foi eluída através de uma microcoluna com o auxílio de uma seringa, sendo depois a resina lavada com solução específica (Column Wash Solution). Procedemos à secagem da resina por centrifugação, 2min. a 12000rpm. Os plasmídeos ligados à resina foram, então, eluídos com água estéril (50 $\mu$ l) também por centrifugação a 12000rpm durante 20segundos.

Duas aliqota destes “minipreps” foram utilizadas para confirmação da presença do *insert*, o que foi feito por digestão para libertar o *insert*. Para a digestão, que decorreu durante 1 hora a 37°C sem agitação, foram utilizadas as enzimas de restrição Nco I e Sal I, conforme Figura I-5. Confirmou-se a presença do *insert* por electroforese em gel de agarose, conforme o procedimento referido no ponto 5.

As amostras dos “minipreps”, foram conservadas a -20°C para utilização posterior, nomeadamente, sequenciação.

## **8-Sequenciação de cDNA**

O conhecimento da identidade de um determinado fragmento de DNA só é possível após a sua sequenciação. Todas as técnicas de sequenciação de DNA se baseiam no facto de, fragmentos com diferentes tamanhos poderem ser separados por electroforese, (Bankier *et al.*, 1989).

O método de sequenciação utilizado foi o *didesoxi method*, inicialmente desenvolvido por Fred Sanger em 1977 (Peters, 1993) modificado, pois não foram utilizados *primers* marcados radioactivamente. Segundo este processo, o crescimento de cada cadeia nascente é interrompido pela incorporação de um ddNTP, o qual por ausência do grupo hidroxilo em 3' impede a ligação do dNTP seguinte. Virtualmente nos tubos de terminação (cada tubo de terminação tem um único tipo de ddNTP), todos os fragmentos possíveis, terminando sempre no mesmo ddNTP, foram formados.

Utilizamos o T7 Sequencing Kit (Pharmacia) sendo a marcação radioactiva feita através da utilização de  $^{35}\text{S}$  dATP (Amersham) que são incorporados nas cadeias nascentes. A DNAPolimerase T7, comercialmente conhecida como Sequenase, apresenta a vantagem de incorporar com igual eficácia dNTPs, ddNTPs e  $^{35}\text{S}$  dATP. Os *primers* usados foram T7, *primer* directo, e SP6, *primer* reverso, de acordo com o vector utilizado para a clonagem do produto de PCR.

Os plasmídeos foram desnaturados com NaOH 2M, EDTA 2mM durante 30 minutos a 37°C. de seguida foram precipitados com Acetato de Sódio 3M e Etanol (100%) durante 3 horas a -80°C. Por centrifugação (15 min. a 12000rpm) concentraram-se os plasmídeos num sedimento que, depois de seco, foi ressuscitado em 26µl de água estéril de forma a obtermos a concentração necessária: 1.5µg/10µl. As etapas que permitiram a sequenciação foram as seguintes:

A - Reacção de “annealing” Foram feitas duas misturas, respectivamente com o *primer* directo e com o *primer* reverso. As quantidades estão expressas na Tabela I-4.

Plasmídeo	10µl
<i>Primer</i> (T7 ou SP6)	2µl
Tampão de “annealing”	2µl

Tabela I-4 - Mistura de “annealing”.

Estas misturas foram incubadas a 60°C durante 10min. e de seguida arrefecidas, 15min. à temperatura ambiente, para que ocorresse o “annealing”.

B - Reacção de marcação Às duas misturas anteriores adicionaram-se 1µl de <sup>35</sup>SdATP, 3µl de mistura dos quatro tipos de nucleotídeos e 2µl de enzima Sequenase diluída (1:5) no tampão de diluição do “kit”. Deixou-se incubar durante 5min. à temperatura ambiente.

C - Reacção de terminação. Foram feitas duas séries de quatro tubos, respeitantes aos quatro nucleotídeos de terminação. Cada tubo, de cada série, continha 2.5µl de uma mistura dos quatro dNTP e apenas um tipo de ddNTP. O *ratio* entre o ddNTP e o respectivo dNTP era de 0.14. Estes tubos foram mantidos a 37°C durante 3min., após o que se adicionou a cada tubo da primeira série 4.5µl da reacção de marcação feita com o *primer* directo e à segunda série juntou-se também a cada tubo 4.5µl da reacção de marcação feita com o *primer* reverso. A subsequente incubação decorreu a 37°C 5min, e findo este período de tempo adicionou-se a cada tubo 5µl de solução para parar a reacção (EDTA 0.2M).

O resultado da sequenciação, após desnaturação pelo calor (80°C, 2min.), foi electroforizado num gel de poliacrilamida (8%), desnaturante pela presença de ureia (50%).

A voltagem utilizada (1500-1700V) não só proporcionou a separação dos fragmentos de DNA, como permitiu que a temperatura do gel, 50-60°C, fosse desnaturante diminuindo efeitos como *smiling* e *smear*.

No final da electroforese o gel foi retirado, lavado com uma solução aquosa de 10% de ácido acético e 10% de metanol (eliminação da ureia), seco sob vácuo e foi posto a autorradiografar em filme Kodak-X Omat, à temperatura ambiente. Após o período de exposição, 16 horas, procedeu-se à revelação do filme e à leitura da sequência respeitando-se o sentido 5' → 3'.

A sequência obtida foi posteriormente confirmada e completada por sequenciação automática.

## C-RESULTADOS

### 1- Extração de RNAtotal

A quantificação das extracções de RNAt estão resumidas na tabela I-5.

Peso (g) do tecido (pituitárias)	Abs. 260nm	Abs. 280nm	<i>ratio</i>	concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Peso total de RNAt ( $\mu\text{g}$ )	Amostra
0.0026	0.197	0.068	1.87	0.47	47	1
0.0034	0.351	0.21	1.88	0.84	84	2
0.0028	0.195	0.073	1.87	0.46	46	3
0.0021	0.22	0.13	1.76	0.52	52	4

Tabela I-5 - As aliquotas para a leitura estavam diluídas 1:60 em água Depc. A calibração do espectrofotómetro foi feita com água Depc. O RNA foi lido no comprimento de onda 260nm, enquanto que aos 280nm são quantificadas as proteínas. A leitura óptica que permitiu a avaliação da concentração foi feita num espectrofotómetro (Pharmacia Genequant).

O cálculo da concentração das amostras foi feito admitindo que 1 UA (Unidade de Absorvância), corresponde a  $40\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNA. O *ratio* (Abs260nm/Abs280nm) permite avaliar o grau de contaminação das amostras. Valores de *ratio*, situados entre 1.8 e 2.0, indicam a pureza da amostra. Valores muito inferiores a 1.8 revelam contaminação com proteínas ou com fenol, (Sambrook *et al*, 1989).

A respectiva electroforese das amostras revela, nitidamente as duas bandas de RNA ribossómico 28S e 18S. Não há contaminação com DNA, pois não são visíveis bandas junto aos poços. De forma menos nítida são visíveis bandas de RNA não ribossómico, Figura I-6.

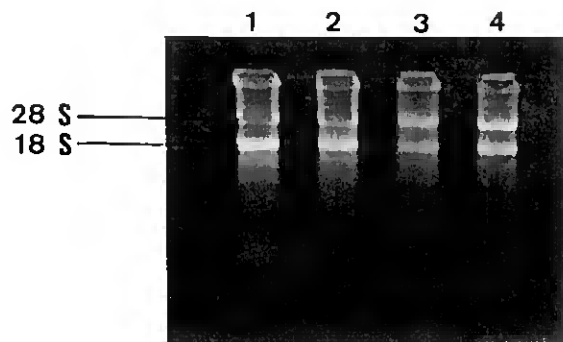


Figura I-6 - Electroforese das amostras de RNAtotal 1, 2, 3 e 4 respectivamente nas pistas 1, 2, 3 e 4.

Apenas na amostra 1, (pista 1), se verifica alguma degradação de RNA, pois observam-se fragmentos de pequeno tamanho na parte inferior do gel. Nas restantes amostras não parece haver degradação. Conforme já foi referido o RNA é visível devido à presença do brometo de etídio.

## 2- PCR

Após a electroforese dos produtos do PCR foi possível identificar a banda esperada. Através do marcador de peso molecular estimamos que a banda teria um valor entre 394bp e 344bp, conforme FiguraI-7.

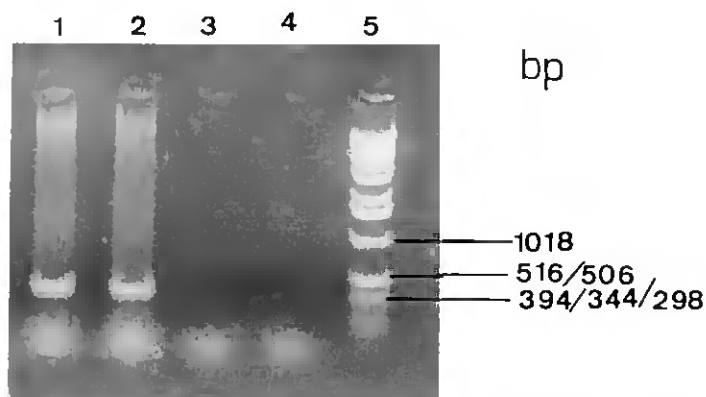


Fig I-7 - Nas pistas 1 e 2 são visíveis as bandas esperadas. Nas pistas 3 e 4 foram electroforizados os dois controlos negativos: em 3 controlo do PCR e em 4 controlo à síntese de cDNA, conforme referido no ponto 4 de Métodos. Na parte inferior do gel, nas pistas de 1 a 4 é visível a dimerização dos *primers*. Na pista 5 observamos o marcador de peso molecular 1KB DNA Ladder. Tal como para o RNA, também a visualização do DNA é devida à presença do brometo de etídio, cujas moléculas se intercalam na dupla hélice de DNA.

Na Figura I-8 observamos a mesma banda após a electroforese feita para a sua excisão.

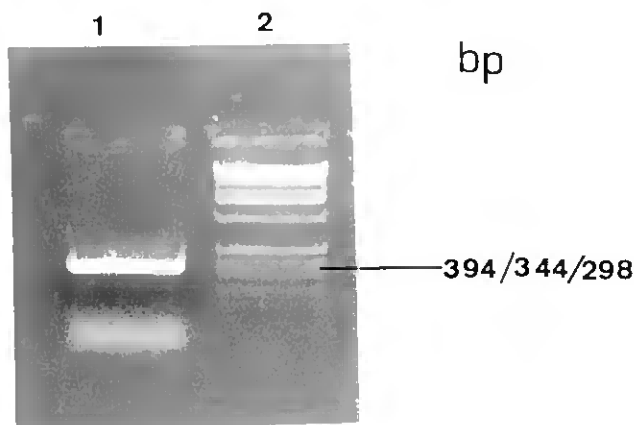


Figura I-8 - Electroforese em gel de agarose 0.8%. Esta electroforese foi feita em gel de agarose de baixo ponto de fusão, de modo a aumentar o rendimento da purificação do DNA. Na pista 1 o produto do PCR, e na pista 2 o marcador de peso molecular 1KB DNA Ladder.

### 3- Confirmação da clonagem

Conforme descrito, no ponto 7 dos métodos, confirmou-se o sucesso da clonagem pela libertação do insert através de digestão com enzimas de restrição. A electroforese dos fragmentos resultantes da digestão, é observável na Figura I-9.

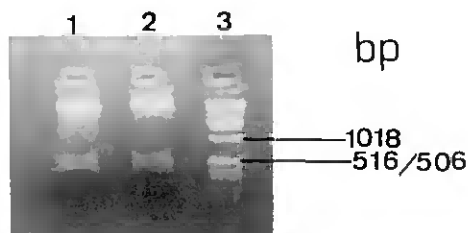


Figura I-9 - Nas pistas 1 e 2 observam-se os “inserts” e perto dos poços do gel, os plasmídeos linearizados. Na pista 3 encontra-se o marcador de peso molecular 1KB Ladder.

O tamanho do “insert” revela-se um pouco superior ao verificado antes da clonagem. Esta observação está de acordo com a digestão efectuada, pois, de ambos os lados do “insert” existe uma fracção do vector, cujo tamanho depende das enzimas de restrição utilizadas.

#### 4- Sequenciação

A leitura da sequenciação do fragmento clonado, (cDNAds 361bp) apresentou a sequência de nucleotídeos presente na Figural-10. Esta sequência após comparação com outras sequências de cDNA mostrou ser um fragmento codificante, de uma parte, da hormona prolactina.

```

1
5' CCC ATC GAC AAG GAG CAA GCT CTG CAA TTA TCA GAG
   TCG GAC CTA TGT CAG TGG CTC GCT CCC TGC TCC AAG
   CCT GGC AAG ACC CCN TGG TAG ACC TGT CCA ACT CTG
   CCA ACA GCC TGC TTC ACC CAT CCC AAA GCA GCA TTT
   CCA ACA AGA TCC GGG AGC TTC AGG AGC ACT CCA AGA
   GCC TGG GAG ATG GGC TGG ATA TTC TAT CTG GCA AGA
   TGG GTC CAG CAG CTC AGG CCA TCT CCT CAC TGC CCT
   ACA GAG GGT CCA ATG ACA TCG GCG AGG ACA ACA TTT
   CCA AAC TGA CCA ACT TCC ATT TCC TGT TGT CCT GCT
   TCC GCC GCG ACT CTC ACA AGA TCG ACA GCT TCC TGA A 3'
                                     361

```

Figura I-10 - Sequência do fragmento de cDNAds 361bp, codificante de PRL. As regiões dos *primers* utilizados, encontram-se sublinhadas.

Esta sequência foi enviada para o GenBank, BLAST E-Mail Server (<blast@ncbi.nlm.nih.gov>), para a determinação do grau de similitude entre a sequência do fragmento 361bp, (Figura I-10), por nós obtida, e sequências, de cDNA de outras espécies, do banco de dados. E também, determinação do grau de homologia entre a região de proteína codificada pelo mesmo fragmento de cDNAds (Figura I-10) com outras proteínas.

1º - Comparação entre a sequência de nucleotídeos do fragmento de 361bp com o cDNA de PRL de diversos peixes.

- i) O Alinhamento do cDNAds 361bp (sonda), com o cDNA de PRL de robalo (*Dicentrarchus labrax*) indica 85% de similitude, conforme Figura I-11.



Espécie	Percentagem de similitude
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (carpa de prata)	73
<i>H. nobilis</i> (carpa de cabeça grande)	74
<i>Oreochromis mossambicus</i> (tilápia) (PRL I)	77
<i>Oreochromis mossambicus</i> (tilápia) (PRL II)	76
<i>Oncorhynchus keta</i> (chum salmon)	67
<i>O. tshawytscha</i> (salmão chinês)	69
<i>Salmo salar</i> (salmão do atlântico)	72
<i>Coregonus autumnalis</i>	68

Tabela I-6 - A similitude entre a sonda e outras seqüências de cDNA referentes à PRL de peixes varia entre 67% e 77%.

2º- O alinhamento do fragmento de proteína codificado pelo fragmento de cDNAs sequenciado revelou as seguintes homologias, em relação à PRL de outras espécies.

i) O alinhamento obtido situa-se entre os aminoácidos 78 e 197 da PRL de robalo (*Dicentrarchus labrax*) e mostrou uma homologia de 83.3%, conforme Figura I-12. Optámos por não numerar os aminoácidos do fragmento de PRL de dourada, uma vez que não temos a seqüência de toda a proteína.

\*

Dourada	<b>PIDKEQALQ</b> LSSEDLMSVAR <b>SL</b> LQAWQDP-VDLNSANSLLHP
Robalo	<b>PIDKEQALQVSEADLLS</b> IVRSLLQAWRDP <b>LVILST</b> SANTLPH <b>P</b>
	66
Dourada	<b>SQSSISNKIRELQ</b> EHSKSLGDGLDILSGKMG <b>PAAQAISS</b> LPYRG
Robalo	<b>AQNSISTKVQELLEHTK</b> SLGDGLDILSGK <b>FGPAAQSISS</b> LPYRG
Dourada	<b>SNDIGEDNISKLT</b> NFHFLLSCFRRDSHKIDSFL
Robalo	<b>GNDISQDRISRLT</b> NFHFLLSCFRRDSHKIDSFL

185

Figura I-12 - Num total de 120 aminoácidos 20 são diferentes o que significa que a homologia entre PRL de dourada e PRL de robalo, nesta região, é de 83.3%. Os aminoácidos coincidentes estão em negrito. O asterisco indica que o correspondente triplo do cDNA era de terminação.

ii) Em relação a outros peixes a homologia observada, encontra-se resumida na tabela I-7.

Espécie	Percentagem de homologia
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (carpa de prata)	59
<i>H. nobilis</i> (carpa de cabeça grande)	60
<i>Oreochromis mossambicus</i> (PRL I)	78
<i>Oreochromis mossambicus</i> (PRL II)	78
<i>Oncorhynchus keta</i> (chum salmon)	68
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (salmão chinês)	68
<i>Salmo salar</i> (salmão do atlântico)	67
<i>Coregonus autumnalis</i>	68

Tabela I-7 - Verificamos que o grau de homologia varia entre 59 e 78%

Os resultados apontam no sentido de o fragmento de cDNAs, por nós obtido e sequenciado ser, de facto, codificante da PRL de dourada. Observamos maiores valores de similitude nos alinhamentos dos nucleotídeos, entre 68 e 78%, do que em relação ao grau de homologia entre os polipeptídeos valores entre 59 e 78%. Esta diferença era esperada devido à preferência do relação codão/aminoácido que, conforme já referimos, é variável de espécie para espécie.

iii) No que respeita ao grau de homologia, do fragmento de PRL de dourada, com a PRL de Tetrápodes, obtivemos os resultados expressos na tabela I-8.

<b>Espécie</b>	<b>Percentagem de homologia</b>
1- <i>Bufo japonicus</i>	46
2- <i>Crocodylus novaegineae</i> (PRL I)	49
3- <i>Crocodylus novaegineae</i> (PRL II)	49
4- <i>Gallus gallus</i>	46
5- <i>Meleagris gallopavo</i>	41
6- <i>Arabian camel</i>	44
7- <i>Felis catus</i>	47
8- <i>Mustela vison</i>	46
9- <i>Macaca muatta</i>	43
10- <i>Homo sapiens</i>	43

Tabela I-8 - Grau de homologia entre o fragmento de proteína (deduzida a partir do fragmento de cDNAs 361bp) de PRL de dourada e proteínas PRL de algumas espécies de tetrápodes. A homologia varia entre os 41-49%. (1-anfibio, 2 e 3-répteis, 4 e 5-aves, 6 a 10-mamíferos).

A homologia do fragmento de PRL, em relação aos tetrápodes constantes da tabela I-8 varia entre 41-49%. Como esperado a homologia é inferior à encontrada em relação aos peixes teleósteos, 59-78%, (tabela I-7). Não só porque a dourada está filogeneticamente mais afastada dos tetrápodes do que dos teleósteos, como também devido à evolução, que continuando após os momentos de divergência, pode ter originado mutações que provocando substituições de aminoácidos na proteína não afectaram o domínio(s) de ligação ao receptor, nem lhe retirou a funcionalidade.

**PARTE II**

---

## PARTE II - Hibridização *in situ* para confirmação da funcionalidade e especificidade da sonda, fragmento de cDNA codificante de PRL

### A-INTRODUÇÃO

Esta técnica, desenvolvida há cerca de 20 anos por Pardue e Gall, (1969), e independentemente por John *et al.*, (1969), (in Nonradioactive *in situ* hybridization, Application Manual - Boehringer) , permite detectar sequências de ácidos nucleicos, (DNA ou RNA) em cortes histológicos. Sondas marcadas cuja sequência de nucleotídeos é complementar a regiões de DNA ou RNA, dos tecidos em estudo, revelam a presença de sequências específicas destes ácidos nucleares, por hibridizarem com os seus complementares. Por exemplo, utilizando sondas marcadas complementares ao RNAm de determinado gene, podemos verificar se esse gene é, ou não, expresso no tecido em estudo. O método utilizado para a detecção dos híbridos (sonda marcada hibridizada com o ácido nucleico complementar) depende do tipo de marcação da sonda.

No presente trabalho avaliamos a funcionalidade e especificidade da sonda, cuja produção se encontra descrita na Parte I, utilizando-a na forma de sonda reversa de RNA, na detecção da expressão do gene codificante da PRL em cortes histológicos de pituitária de dourada. Diversos estudos provam que a hormona PRL, conforme referido na Introdução, é sintetizada por células da *rostral pars distalis*, (PPD), enquanto a GH o é em células da *proximal pars distalis*, (PPD), da adenohipófise, Figura II-1 e Figura II-2 (A e B, nas quais: a-região anterior, p-região posterior).

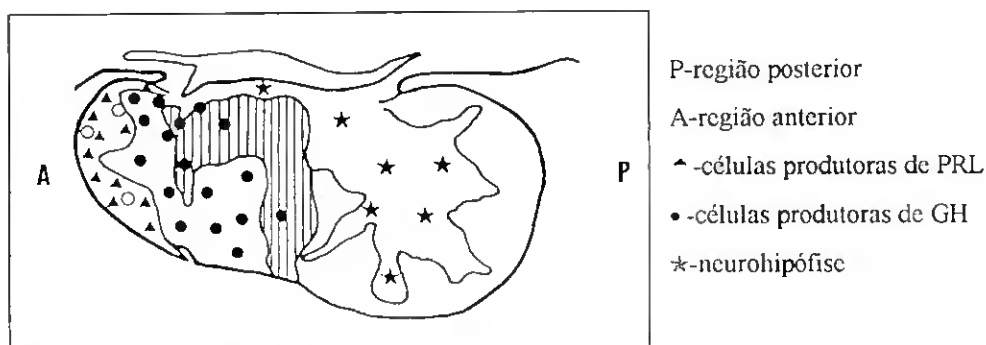


Figura II-1 - Esquema de um corte sagital da hipófise de *Sparus aurata*, onde se indica a localização das células produtoras de GH e de PRL. (extraído de Power and Canário, 1992).

A presença das proteínas GH e PRL, nas referidas células, foi verificada por D.M. Power *et al*, (1996), através de estudos imunológicos, Figura II-2.

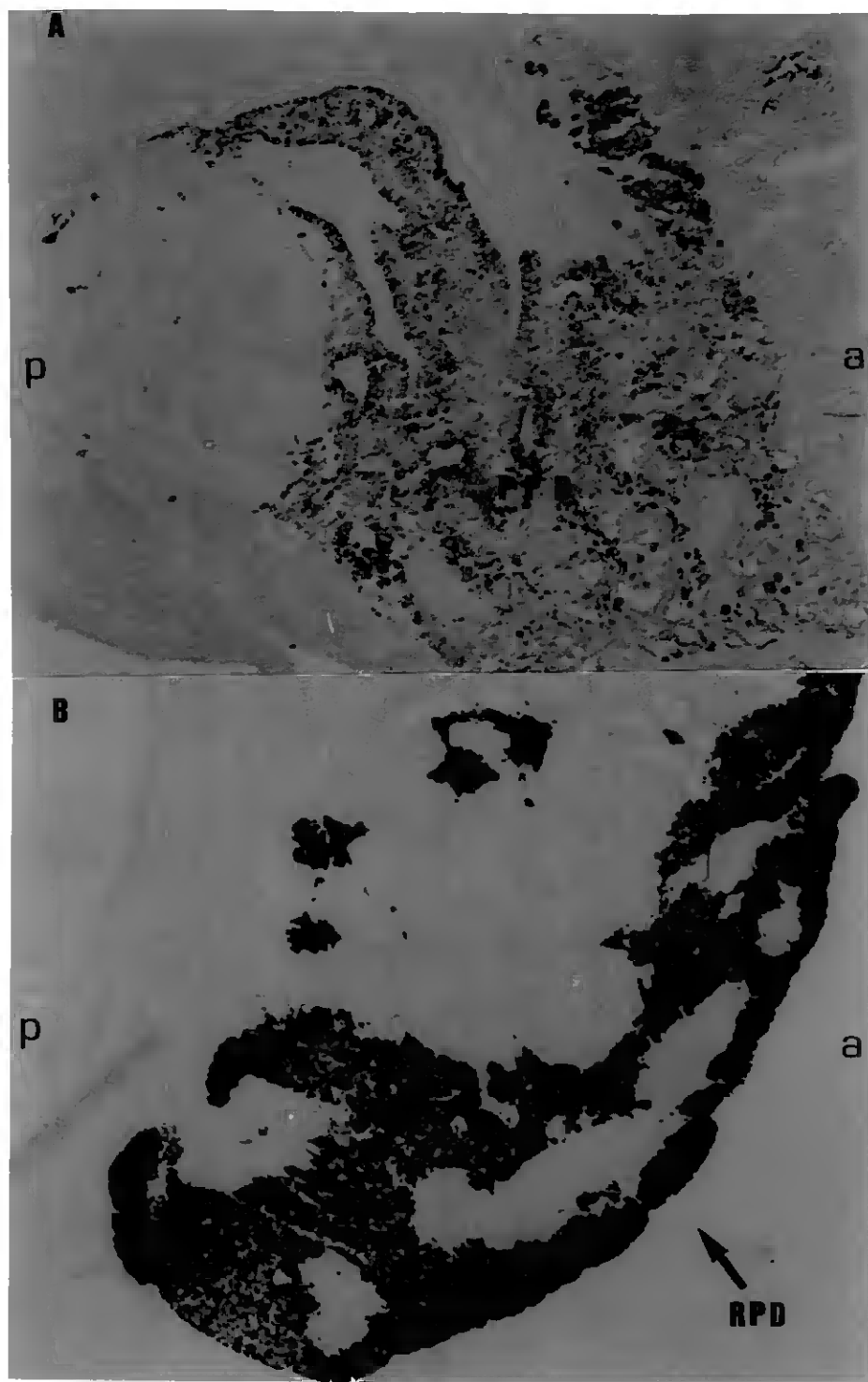


Figura II-2 - (fotografias cedidas por D. Power) - Cortes sagitais de parte da pituitária de dourada. (*Sparus aurata*).

**A-** Detecção de células imunoreactivas a anticorpos anti-GH na região *proximal pars distalis* (PPD). As células foram coradas pelo método imunoperoxidase usando anticorpos anti-GH da mesma espécie.  
**B-** Detecção das células de PRL na região *rostral pars distalis*. O método de coloração das células foi o mesmo das células de GH, tendo-se utilizado anticorpos anti-PRL de salmão (*Oncorhynchus kisutch*).

Como em cortes histológicos de pituitária há RNAm cuja tradução originaria a hormona PRL, procedeu-se à síntese, *in vitro*, de uma sonda reversa de RNA de PRL. O método de marcação, da sonda de RNA usada na hibridização *in situ*, foi baseado no sistema Dioxigenina de Boehringer Mannheim. A dioxigenina é um esteróide extraído de duas espécies de plantas do Género *Digitalis*, não se conhecendo, na natureza, outros seres vivos capazes de a produzir, ou capazes de produzir um seu anticorpo. A sonda de RNA foi sintetizada na presença de moléculas de Dig-UTP, (Dioxigenina-UTP), i.e. nucleotídeos de uracilo ligados à dioxigenina através de uma molécula linear de 11 carbonos na posição 5 do anel pirimídico, Figura II-3.

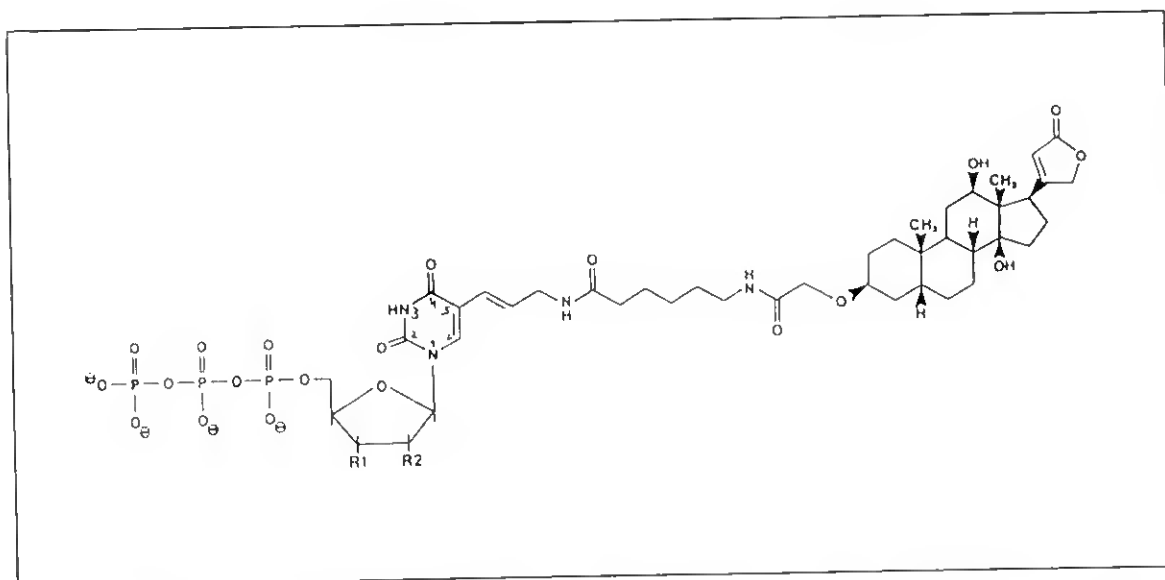


Figura II-3 - Esquema da ligação da dioxigenina ao uracilo: Dioxigenina-UTP (R1-OH, R2-OH), (extraído de "Nonradioactive *In Situ* Hybridization, Application Manual" de Boehringer Mannheim Biochemicals).

Os híbridos foram revelados por imunocitoquímica. Usamos anticorpos anti-dioxigenina conjugados com a enzima fosfatase alcalina, que actuando no substrato NBT-BCIP origina um precipitado de cor azul, cuja intensidade e localização nos revela a presença das células produtoras do ácido nucleico complementar da sonda. A Figura II-4 representa, esquematicamente, o processo de detecção dos híbridos.

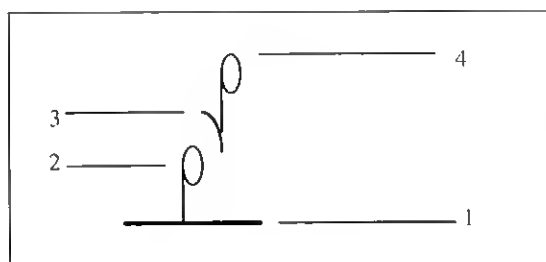


Figura II-4 - Representação esquemática do processo de detecção dos híbridos: 1-híbrido (ribossonda/RNA<sub>m</sub>); 2-dioxigenina; 3-anticorpo anti-dioxigenina; 4-fosfatase alcalina.

Como a sonda utilizada é de RNA e seu alvo é RNA<sub>m</sub>, todos os procedimentos foram feitos em condições inibitórias da acção de RNAses, com excepção do procedimento para eliminar a sonda não hibridizada, em que se usou uma RNase.

## B-MÉTODOS

### 1-Preparação da sonda reversa de RNA

Como se pretendia sintetizar uma sonda de RNA complementar ao RNAm, de PRL, presente nas células RPD da pituitária, i.e. uma sonda reversa de RNA, de PRL, procedemos à orientação do “insert” no vector para determinarmos qual a enzima de restrição que deveríamos usar para a linearização do vector, e qual a RNAPolimerase (T7 RNAP ou SP6 RNAP) deveria ser usada para a síntese da sonda.

O vector pGEM-T (Promega) clonado com o “insert” 361bp, referido na Parte I, foi linearizado e a síntese da sonda foi catalizada pela enzima T7 RNAPolimerase, na presença de Dig-UTP.

A sonda de RNA numa concentração de 1µg/ml foi, gentilmente, preparada e cedida pela Prof. Doutora Deborah. M. Power.

### 2-Pré-hibridização de cortes histológicos de pituitária

Foram utilizados cortes sagitais de pituitária de dourada de 6µm de espessura, fixados em Bouin Holand, existentes no laboratório.

**A - Desparafinação e rehidratação.** Os cortes foram desparafinados em xilol, 2x, 5min, com agitação suave. Para a rehidratação, os cortes sofreram as seguintes incubações, sempre com agitação suave:

- c) 2x 5min. em metanol 100%
- b) 5min. em metanol/água Depc (75:25)
- c) 1min. em iodo/metanol/água Depc (1:70:29)

- d) 5min. em tiosulfato de sódio (5%)
- e) 5min. em metanol/água Depc (50:50)
- c) 5min. em PTw (1x PBS pH 7.4:0,1% Tween 20)/água Depc (75:25)
- f) 3x 5min. em PTw

Os passos c e d têm como objectivo eliminar os metais pesados do Bouin Holand, evitando-se o surgimento de artefactos.

**B- Digestão com Proteinase K e refixação dos cortes.** Os cortes foram sujeitos a digestão com Proteinase K (0,04µg/ml de PTw), em atmosfera húmida de 2xSSC, durante 5 minutos. Deste modo aumenta-se a permeabilidade das células, permitindo uma maior difusão da sonda. A refixação foi feita por 20min. com paraformaldeído 4% em PTw, à temperatura ambiente. Após a refixação os cortes foram lavados e conservados por 20min. em PTw.

**C- Pré-Hibridização** - Sobre cada corte, depois das lâminas escorridas, foram colocados 20µl de solução de pré-hibridização. Para a preparação desta solução, a 5ml de água Depc foram adicionados

- 2,5ml de Formamida desionizada
- 1ml de 20xSSC
- 100µl de 50x Denhart's
- 100µl de RNAtferência (50ng/ml)
- 100µl de CHAPS (2%)
- 100µl de Heparina (10mg/ml)

A pré-hibridização decorreu durante 3 horas a 60°C. Após esta incubação escorreram-se as lâminas e sem deixar secar os tecidos procedeu-se à hibridização.

### 3- Hibridização e Detecção dos Híbridos

A sonda, por ser de RNA foi desnaturada durante 5min. a 75°C, após o que se lhe adicionou a solução de hibridização:

50% de formamida  
5x SSC  
1mg/ml de Torula RNA  
100 µg/ml de heparina  
1x Denhart's  
0,1% de Tween 20  
0,1% de CHAPS  
10Mm de EDTA

Os cortes foram cobertos com a solução de hibridização, na qual a concentração da sonda era de 0,01µg/µl. A hibridização decorreu durante a noite a uma temperatura de 55°C, sem agitação, em condições herméticas e para evitar evaporação de alguns dos componentes da solução, cobriram-se os cortes com parafilme.

Após a hibridização, para eliminar os híbridos imperfeitos, procedemos a lavagens dos cortes histológicos, a 58°C:

1x10min. em 2xSSC  
2x10min. em 2xSSC suplementado com CHAPS a 2%

A função do CHAPS é bloquear locais não ocupados pela sonda, pois é, em parte, estruturalmente semelhante à dioxigenina.

A digestão da sonda não ligada foi feita a 37°C durante 30min. com RNase numa concentração final de 20µg/ml em PTw. Os cortes foram novamente lavados a 58°C em 2xSSC, e de seguida colocados em PTw durante 10min. Findo este período de tempo os cortes foram incubados com o anticorpo da dioxigenina conjugado com fosfatase alcalina, durante 2horas, e de seguida lavados, 2x10min., em PTw, à temperatura ambiente. O bloqueamento, dos locais não ligados foi feita com solução bloqueante a 1% (numa solução de 0,05g de gelatina dissolvida em solução tampão de

ácido málico), durante 1 hora à temperatura ambiente. A solução bloqueante tem como função diminuir a coloração não específica dos cortes. Após este bloqueamento procedemos à coloração dos híbridos.

Para a coloração dos híbridos incubamos os cortes, durante 10min., em solução corante:

1ml de Tris pH9.5  
200µl de NaCl 5M  
500µl de MgCl<sub>2</sub> 1M  
8ml de água estéril

Após este período de incubação foram adicionados 35µl de NBT, Nitrobluetetrazona, (75mg/ml em 70% DMF) e 45µl de BCIP, 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl Fosfato (100% em DMF), por cada 10ml de solução corante.

O desenvolvimento do processo de coloração, no escuro e em agitação suave, foi controlado por observação microscópica, em períodos de 1 hora, de forma a avaliar a especificidade e intensidade da coloração. Após 14 horas, a coloração foi interrompida, substituindo a solução de coloração por água destilada onde, se procedeu à lavagem dos tecidos durante 30min. Os cortes, foram, posteriormente, sujeitos a desidratação, crescente e sequenciada, em etanol e secos à temperatura ambiente. Após a secagem, procedeu-se à sua lavagem, em xilol a 50°C, durante o tempo necessário, para que os cortes se apresentassem transparentes. Depois deste processo, “clearing”, procedeu-se à sua montagem em DPX (BDH), transformando-os em preparações definitivas.

## C-RESULTADOS

Os resultados obtidos pela hibridização *in situ*, parecem comprovar a funcionalidade e a especificidade da sonda. A localização das células que contêm os híbridos é identificada pela coloração azul, resultante da acção da enzima fosfatase alcalina no substrato NBT-BCIP.

Comparando a Figura II-5 com a Figura II-2 B, onde se observa a localização da hormona PRL, através da utilização de anticorpos anti-PRL, verificamos a coincidência da localização do RNAm de PRL e da proteína PRL. Esta observação leva-nos a concluir que a sonda por nós produzida é funcional, uma vez que hibridiza com o RNAm cuja a localização era a esperada, conforme o referido por Nishioka, *et al.*, (1993).

Para avaliarmos a especificidade da sonda comparamos os nossos resultados Figura II-5, com a localização do RNAm de GH, Figura II-6, e respectiva proteína, Figura II-2 A, em cortes histológicos de pituitária de dourada. Os resultados expressos na Figura II-6, referentes à localização das células da hipófise que expressam o gene da hormona GH, foram obtidos cumprindo a mesma metodologia utilizada na localização do RNAm de PRL, utilizando uma sonda específica para o RNAm de GH. A observação da diferente localização das células da GH e das células da PRL leva-nos a concluir que a sonda de PRL é específica pois, não hibridiza com o RNAm das células produtoras de GH, apesar de PRL e GH pertencerem à mesma família.

Pelo exposto podemos concluir que a sonda, produzida para detectar ácidos nucleicos correspondentes à hormona PRL, é específica, pois só hibridiza com RNAm de PRL na região RPD, onde se localizam as células que expressam o gene da hormona prolactina.

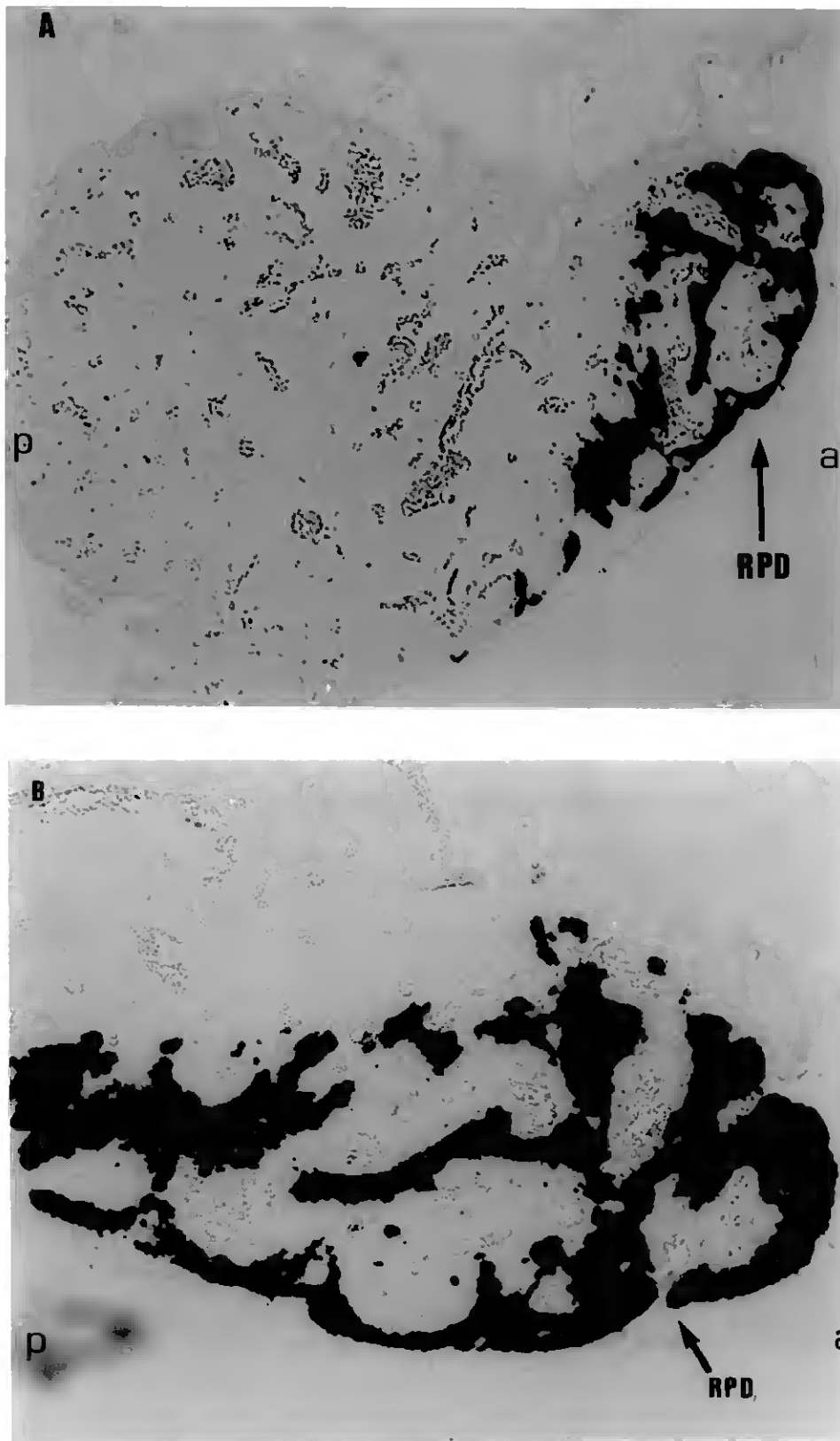


Figura II-5 - Cortes histológicos da hipófise de dourada, (A-x40; B-x200), em que se destacam, pela coloração azul específica, as células que, na região RPD, expressam o gene da hormona PRL. Verificamos que a sonda não hibridiza com RNAm de células da região PPD, responsáveis pela expressão da hormona GH ou com células da SL na *pars intermedia*, apesar das três hormonas serem da mesma família. (a-zona anterior, p- zona posterior)

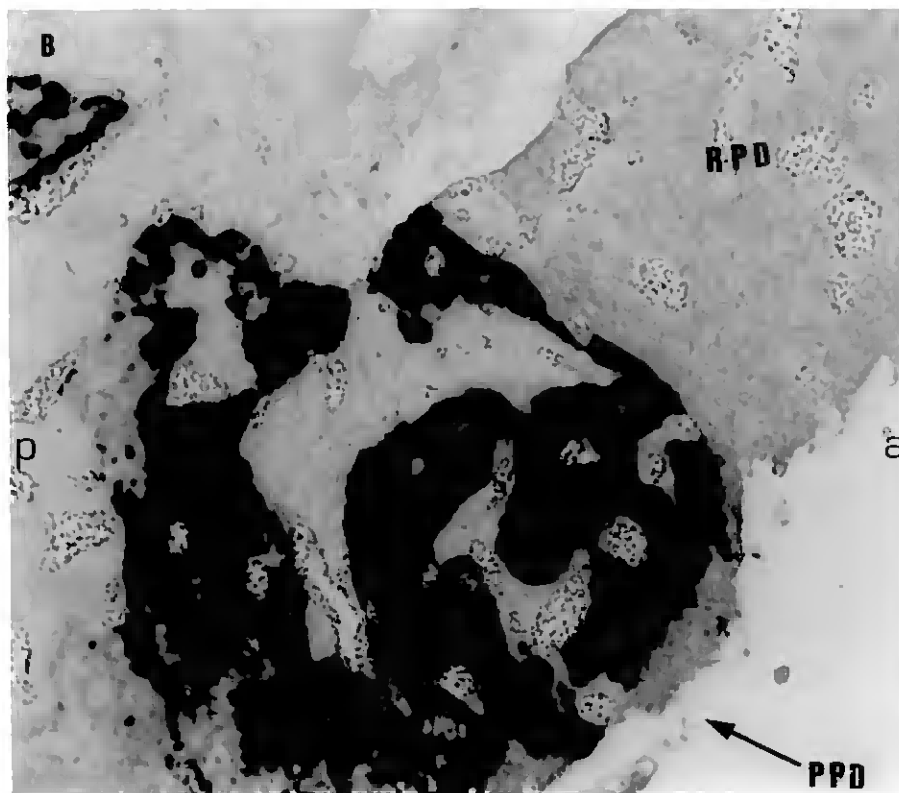
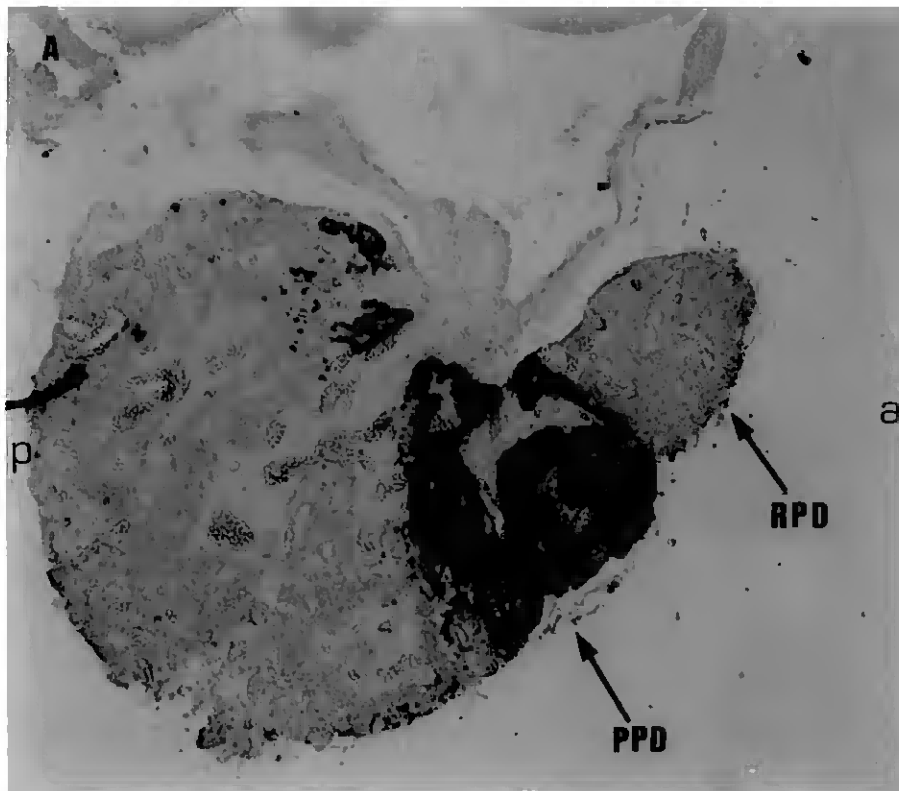


Figura II-6 - Hibridização *in situ* de cortes histológicos da hipófise de dourada. (A- x40; B- x200), em que se usou uma sonda reversa de GH, marcada pelo sistema da Dioxigenina. Destacam-se, pela coloração azul específica, as células da região PPD que expressam o gene da hormona GH. Está assinalada a região RPD, cujas células produzem a prolactina. (a-zona anterior, p-zona posterior) (fotografias cedidas por D. Power).

**PARTE III**

---

### PARTE III - Produção de um banco de cDNA, de pituitária de dourada, em bacteriófagos $\lambda$ .

#### A-INTRODUÇÃO

Basicamente este método baseia-se na clonagem, em vectores fágicos, dos diferentes cDNA de dupla cadeia, produzidos a partir de extractos de RNAm de um determinado tecido. Estes vectores, após a clonagem, são recobertos pelas cápsulas dos bacteriófagos. Formam-se, então, bacteriófagos com poder infeccioso em relação às suas células hospedeiras - bactérias. As bactérias infectadas, i.e., nas quais os fagos introduziram o seu material genético clonado, ao crescerem sobre agar, sofrem o ciclo reprodutivo do fago que termina com a lise das bactérias e consequente libertação das cópias do fago.

Cada cápsula fágica só permite a introdução de um vector clonado pelo que, cada bacteriófago representa a expressão de um só RNAm maduro. Teoricamente só os vectores clonados apresentam um tamanho susceptível de ser envolvido pela cápsula fágica, porque só estes vectores, apresentam a inserção de uma fracção de DNA que substitui a que foi retirada ao DNA original do bacteriófago, (Griffiths *et al*, 1993).

O vector fágico que utilizamos foi o  $\lambda$  Zap II, (Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit - Stratagene). Este vector, apresenta as seguintes características:

A- Permite a clonagem de “inserts” com tamanho até 10 Kilobases.

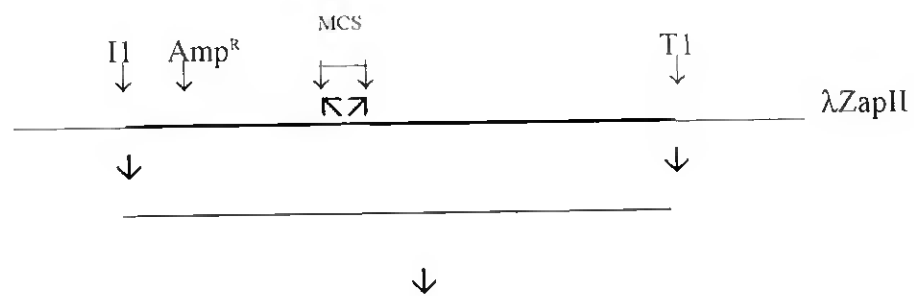
B- No Multiple Cloning Site (MCS) está inserido o gene da  $\beta$ -galactosidase, o que permite o rastreio dos vectores clonados/não clonados, pelo sistema IPTG - X-Gal, quando expressos em bactérias capazes de proceder à  $\alpha$ -complementarização da enzima  $\beta$ -galactosidase.

C- “Downstream” e “upstream” em relação ao MCS, estão presentes, respectivamente, sequências de iniciação (II) e de terminação (T1) para a replicação,

da região da cadeia positiva do vector delimitadas por T1 e F1, conforme Figura III-1-A.

Devido à presença das sequências II e T1 é possível proceder à excisão *in vivo* da região delimitada por II e T1, quando o vector fágico se encontra dentro de bactérias *E. coli*, i.e, a referida região, após replicação, circulariza e dá origem ao plasmídeo pBluescript SK(-), contendo o “insert” se, o  $\lambda$ -Zap II tiver sido clonado, Figura III-1-B.

A



B

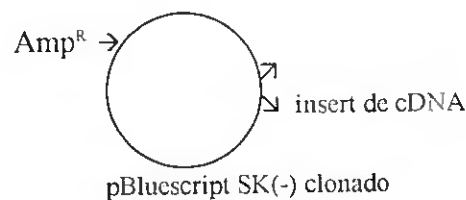


Figura III-1. A- Localização das sequências de iniciação (II) e de terminação (T1) para a replicação da cadeia positiva do vector  $\lambda$  Zap II. Está também assinalado o MCS, e a localização do gene que confere resistência à ampicilina ( $Amp^R$ ). B- Formação do pBluescript SK(-) por circularização, do DNAcadeia simples replicado a partir da região limitada por II e T1. (Esquemas adaptados do manual de instruções do Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit - Stratagene).

A circularização da cadeia replicada, processo equivalente a uma sub-clonagem, resulta na produção dos plasmídeos referidos. Estes plasmídeos são depois recobertos por novas cápsulas fágicas e capazes de infectar bactérias. A selecção dos clones positivos é feita pelo crescimento das bactérias transformadas, em meio suplementado com ampicilina.

Como o nosso objectivo era obter a sequência codificante do gene responsável pela expressão da hormona prolactina, optamos pela construção de um banco de cDNA, e não de um banco de DNA. Porque aqueles, em relação aos bancos de DNA, apenas representam a fracção do genoma que é, de facto, expresso em proteínas, uma vez que o cDNA, sendo obtido por transcrição reversa do RNAm, representa apenas a informação dos exões de determinado gene.

## **B-MÉTODOS**

### **1-Obtenção de RNAmensageiro por Cromatografia de Afinidade**

Este método baseia-se no facto de as moléculas de RNAm, após todo o seu processamento, apresentarem uma região poli-adenilada na sua extremidade 3'. Foram usadas colunas de cromatografia de oligo d(T)-celulose (celulose a que estão ligadas polímeros de Timina). Conforme a amostra de RNAt atravessa a coluna de cromatografia as moléculas de RNAm ligam-se, pelas suas extremidades poli(A), aos polímeros de Timina. Com lavagens sucessivas, de alta força iónica, eliminam-se as moléculas de RNA não poli-adenilado. O RNAm, entretanto retido, é depois eluído com lavagens de baixa força iónica.

O RNAt utilizado foi a mistura da amostra 3 (46µg) e amostra 4(52µg) referidas nos resultados da extracção de RNAt da Parte I. Utilizamos, assim, um total de 98µg de RNAt.

Foi utilizado o QuickPrep Micro mRNA Purification Kit de Pharmacia Biotech. Foi utilizado este método devido ao seu alto rendimento. A concentração e a qualidade das amostras de RNAm foram avaliadas da forma referida para o RNAtotal, na Parte I.

### **2-Síntese de cDNA**

Para esta síntese usamos o TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech). O RNAm, (1.3µg) conservado em etanol (100%) a -80°C foi centrifugado durante 20min., 10000g a 4°C. Após secagem do “pellet”, e feita a sua ressuspensão em 20µl de água “RNase-Free”, a amostra foi desnaturada à temperatura de 65°C por 10min e de seguida colocada em gelo.

Conforme referido no ponto 3 da Parte I, a enzima transcriptase inversa necessita de uma região de cadeia dupla para iniciar a síntese do cDNA. Utilizamos por isso *primers* de Oligo(dT)<sub>12-18</sub> integrantes do “kit”. De acordo com as instruções do fabricante usamos, 0.5µg de Oligo(dT). Concluída a síntese do cDNA de dupla cadeia e feita a sua purificação, em colunas de cromatografia (Sephrose CL-4B) fornecidas pelo mesmo “Kit”, procedeu-se à adição dos “adaptors” com extremidades EcoR I e local interno de corte Not I, FigIII-2. Após nova purificação uma alíquota foi utilizada para determinar a concentração deste cDNA num espectrofotómetro Gene Quant (Pharmacia).

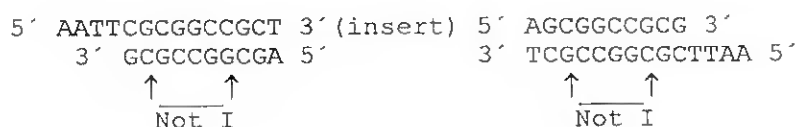


Figura III-2 - Representação dos “adaptors” com extremidades coesivas EcoR I e local de corte Not I. (Adaptado do protocolo de TimeSaver cDNA Synthesis Kit - Pharmacia)

### 3-Clonagem dos fragmentos de cDNA no vector

Os fragmentos de DNA de dupla cadeia foram clonados no vector fágico  $\lambda$  Zap II, (Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit - Stratagene). Um factor importante na clonagem é o *ratio*, (*r*), entre *insert* e vector, [ $r = \text{insert } (\mu\text{g}) / \text{vector } (\mu\text{g})$ ]. De acordo com o protocolo da Stratagene para “inserts” com cerca de 4000bp deve-se respeitar um *ratio* de 0,1. Admitindo que o nosso extracto de RNAm teria moléculas de diversos tamanhos, o que originaria diferentes tamanhos de *inserts*, optámos por experimentar duas misturas de clonagem, que posteriormente seriam quantificados em termos de número de recombinantes.

Procedemos a duas misturas de clonagem com *ratios* de 0.8 na mistura 1, e de 1.8 na mistura 2, conforme tabela III-1.

	Mistura 1	Mistura 2
cDNA	18µl (1.8µg)	8µl (0.8µg)
vector	1µl (1µg)	1µl (1µg)

Tabela III-1 - Misturas de clonagem

A cada tubo de mistura, foi adicionado:

- 1 µl de acetato de sódio 3M;
- 50 µl de etanol (100%) à temperatura de -20°C;
- tampão OPAB 1X para perfazer 19µl.

As misturas foram incubadas a -80°C durante 15min, com o objectivo de, por precipitação, concentrar o vector e o cDNAs a clonar. Após a precipitação as misturas de clonagem foram centrifugadas (10min, 12000 rpm) e o sedimento foi seco. Procedeu-se, de seguida, à ligação dos fragmentos de cDNAs com o vector: o “pellet” foi ressuscitado em 8µl de tampão de ligação e adicionou-se 1µl de T4 DNA Ligase (pura) e 1µl de ATP, diluído (1:75) em tampão de ligação. A incubação para a ligação decorreu durante 15h a 16°C. O tampão de ligação utilizado foi 1x OPOB, (One Phor All Buffer, Pharmacia) de um “stock” original 10x concentrado.

#### 4-Introdução dos vectores nas cápsulas fágicas

Foi utilizado o Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene). A duas alíquotas de cápsulas de fagos foram adicionados 5µl do vector λ Zap II clonado, respectivamente da Mistura 1, (BM1) e da Mistura 2 (BM2), tendo-se deixado incubar a 22°C durante 100min. Depois da incubação juntou-se a cada tubo 500 µl de SM Buffer, e 20 µl de clorofórmio. Foi feita uma centrifugação breve e os sobrenadantes, bancos BM1 e BM2, transferidos para tubos estéreis, a que se adicionou clorofórmio numa concentração final de 0.3%, foram conservados a 4°C.

## 5-Titulação dos bancos BM1 e BM2

Um clone de células *E coli*, estirpe XL1-Blue MRF', (XL1B), foi crescido em LB Broth, (Sigma), suplementado com 0.2% de maltose e 10mM de sulfato de magnésio, durante 16horas a 30°C, com agitação. Após centrifugação (10min., 2000rpm) o sedimento foi ressuspendido em 8ml de 10mM de sulfato de magnésio. Determinámos a densidade da suspensão das células a 600nm e procedemos à diluição necessária para obtermos uma densidade óptica de 0.5. As células foram mantidas em gelo. Sempre que manipulamos bactérias, fizemo-lo em condições de assepsia.

Procedemos à diluição dos bancos (1:10), diluindo 15µl de cada banco em 135µl de SM buffer. A partir desta diluição procedemos à incubação dos fagos com as bactérias de acordo com as quantidades expressas na tabela III-2.

		Células	Fagos
Diluição 10 <sup>-1</sup> banco BM1	tubo 1	200µl	1µl
	tubo 2	200µl	10µl
	tubo 3	200µl	100µl
Diluição 10 <sup>-1</sup> banco BM2	tubo 1	200µl	1µl
	tubo 3	200µl	10µl
	tubo 4	200µl	100µl

Tabela III-2 - Misturas feitas entre fagos e células. A adsorção dos fagos às bactérias permitiu a infecção destas.

Finda a incubação, 15min. a 37°C, para que as bactérias fossem infectadas, o conteúdo de cada tubo foi misturado com 10ml de TOP agar (à temperatura de 48°C) e vertido para uma placa de "Pettri" contendo NZY Agar, (Sigma). As placas foram colocadas numa estufa a 37°C durante 14horas.

## 6-Amplificação dos Bancos BM1 e BM2

Preparámos células *E coli*, estirpe XL1-Blue MRF', como referido no ponto 6, e dispensamos 600µl em dois tubos “ependorf”.

Misturamos os dois bancos, ( aproximadamente 740µl, no total) e procedemos à sua divisão equitativa pelos tubos que continham as células. O restante procedimento foi igual ao descrito no ponto 6. As placas de “Petri” foram colocadas numa estufa a 37°C durante cerca de 9 horas e depois cobertas com 8ml de SM buffer. Permitiu-se a difusão dos fagos para a solução tampão durante 15horas a 4°C, sem agitação. A solução contendo os fagos foi depois colectada para tubos estéreis. A superfície do meio de cultura foi lavada com 2ml do mesmo tampão com agitação suave por 5min e esta suspensão adicionada à anteriormente colectada. De seguida foi adicionado clorofórmio de modo a obtermos 5% de concentração final. Foi feita uma incubação de 15min. à temperatura ambiente seguida de centrifugação a 2000g durante 10min. para sedimentar as células. O sobrenadante, de aspecto límpido, banco ampliado BpitA, foi transferido para novos tubos e suplementado com clorofórmio numa concentração final de 0.3%

## 7-Titulação do banco amplificado (BpitA)

Procedemos a diluições sequenciadas do banco BpitA de pituitária:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  em solução tampão apropriada, (SM buffer). Para a titulação usamos apenas as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  e procedemos às seguintes inoculações de fagos em bactérias, tabela III-3.

		<b>Células</b>	<b>Fagos</b>
Diluição $10^{-3}$	tubo 1	200µl	100µl
	tubo 2	200µl	10µl
Diluição $10^{-4}$	tubo 3	200µl	10µl
	tubo 4	200µl	1µl

Tabela III-3 - Misturas feitas entre fagos e células.

A adsorção dos fagos às bactérias decorreu durante 15min. a 37°C. Finda a incubação, o conteúdo de cada tubo foi, cuidadosamente, misturado com 10ml de TOP agar (à temperatura de 48°C) e vertido para uma placa de “Pettri” contendo NZY Agar. As placas, identificadas de (1) a (4), foram colocadas numa estufa a 37°C durante 14horas.

### 8-Cálculo da percentagem de recombinantes do banco Bpita

Para determinarmos a percentagem de recombinantes utilizamos um método em que as bactérias infectadas com DNA de fagos recombinantes, produzem lisados de cor branca, enquanto que as bactérias infectadas por fagos não recombinantes produzem lisados de cor azul.

A base deste método deve-se à presença conjunta de um indutor do Operão Lac, o IPTG (isopropil tiogalactósido) e de um substrato indicador da actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, o X-Gal (5-cloro-4-bromo-indolil- $\beta$ -D-galactosidase). O vector fágico  $\lambda$  Zap II contém o gene responsável pela expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase, localizado no MCS (Multiple Cloning Site). Quando o vector não sofre clonagem a pauta de leitura do gene da  $\beta$ -galactosidase permanece inalterada e o gene expressa-se correctamente. Contudo esta proteína, para ser activa necessita da complementarização, na sua extremidade amino, do resultado da expressão de um gene do epissoma F' das *E. coli* XL1-BlueMRF'. Ocorrendo esta complementarização forma-se a enzima activa que hidrolizando o X-Gal promove o aparecimento de um produto insolúvel de cor azul, o que significa que os lisados azuis não são recombinantes. No entanto se tiver ocorrido a clonagem do vector, o “insert” ao quebrar a sequência do gene da enzima  $\beta$ -galactosidase, altera-lhe a pauta de leitura. Deste modo não se forma a enzima e o X-Gal permanece inalterado, i.e., o lisado apresentar-se-á branco. Lisados brancos indicam-nos, por isso, a presença de vectores fágicos clonados, (Sambrook, *et al.* 1989; Watson, *et al.*, 1996).

Para calcularmos a percentagem de recombinantes seguimos a metodologia usada para a determinação do título do banco ampliado de cDNA de Pituitária.

Após a incubação de 4µl de fagos, de uma diluição  $10^{-3}$ , com 200µl de células XL1-Blue MRF' (XL1B), adicionamos esta mistura a 10µl de Top agar, a 48°C, suplementado com 30µl de IPTG, (0.5M, em água estéril) e 100µl de X-Gal, (250mg/ml, em DMF). O procedimento protocolar seguinte foi igual ao utilizado no ponto anterior.

## **9-Rastreo do banco Bpita**

### 9.1-Rastreo primário

Incubamos cerca de 50000 fagos com 600µl de bactérias com  $DO_{600nm}$  de 0.5 Unidades de Absorvância (espécie e estirpe referidas no ponto 6, bem como a metodologia). Após a incubação, procedemos à sua mistura com 12ml do Top agar arrefecido até à temperatura de 48°C. A suspensão foi vertida numa placa de Petri contendo NZYagar. Neste caso, e porque se trata de rastrear o banco, foram feitas, em média, 4 a 6 placas de cada vez. Deixámos as placas a 37°C, durante cerca de 8 horas, após o que foram conservadas a 4°C, pelo menos durante 3 horas. Procedemos então à transferência dos fagos, libertados pelas bactérias infectadas, para membranas de nitrocelulose (NCP), (Membrane Hybond-C, Nitrocelulose 0.45µ - Amersham). A transferência, feita em duplicado, foi de 2min, e de 4min., respectivamente, para cada membrana. As NCPs foram de seguida e sequencialmente colocadas durante 5min. sobre folhas de papel Wathman 3M embebidas, respectivamente, em solução desnaturante, solução neutralizante e solução 6xSSC. A fixação do DNA às membranas decorreu durante duas horas a 80°C, e a sua posterior conservação feita a 4°C.

### 9.2-Marcação radioactiva da sonda de PRL

Dos “minipreps” referidos no ponto 7 (Parte I) foram feitas novas digestões para libertar o “insert”. Os produtos da digestão foram electoforesados em gel de agarose e o fragmento de dsDNA, correspondente à PRL, foi excisado e purificado, conforme referido no ponto 5 (Parte I). A quantificação deste DNA-sonda revelou uma concentração de 600ng/ $\mu$ l. Para a sua marcação utilizamos o Readyprime Kit (Amersham). O DNA sonda, 0.5 $\mu$ l, adicionado de 49.5 $\mu$ l de água, foi desnaturado a 100°C durante 3min. e imediatamente incubado durante 5min. em gelo. Destes 50 $\mu$ l pipetamos 45 $\mu$ l para um tubo do Kit Rediprime e, após obtenção de uma mistura homogénea, adicionamos 5 $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. A incubação, que permite a síntese de DNA marcado, decorreu durante 1 hora à temperatura ambiente. A sonda marcada foi depois purificada em colunas de cromatografia (Biorad), nas quais colocamos 2ml de Sephadex G-50. A radioactividade da sonda foi medida num contador de cintilações (Beckman LS 6000 IC). Todas as sondas marcadas apresentaram um valor entre  $2.1 \times 10^7$  cpm e  $1,2 \times 10^8$  cpm.

### 9.3- Pré-hibridização, Hibridização e autorradiografia das membranas

As membranas após a fixação do DNA, ponto 9.1, foram postas em solução de pré-hibridização, cuja composição era, por cada 10ml de solução:

- 3ml de 20x SSC;
- 100 $\mu$ l de SDS 10%;
- 100 $\mu$ l de RNAttransferência 10mg/ml;
- 1ml de 50x Denharts;
- 6ml de água estéril.

A pré-hibridização decorreu durante 3 horas a 60°C, após o que se juntou a sonda desnaturada pelo calor, 3min. a 100°C, e incubada 5min. em gelo. A hibridização foi permitida durante cerca de 16 horas a 55°C.

Procedemos às lavagens das membranas em condições de média estringência. Foram feitas duas lavagens: 10min. e 5min a 50°C, em 4x SSC; 0.1% SDS. As membranas foram depois, envolvidas em película aderente e postas a autorradiografar (filme Kodak X Omat), durante 3 dias a -80°C, em cassetes preparadas com écrans intensificadores.

Após a revelação do filme foi feita a determinação de possíveis positivos, por comparação de cada membrana com o seu duplicado. De seguida e por sobreposição das placas de Petri com as autorradiografias extraímos os fagos, possivelmente positivos, com pipetas de Pasteur. Como se tratava de retirar fagos de um rastreio primário, não foi possível retirá-los isoladamente, mas sim aos grupos em função do sinal positivo da autorradiografia. Os lisados recolhidos foram colocados em 500µl de SM Buffer suplementado com 20µl de clorofórmio, cuja função é criar, após forte agitação um sedimento que contenha as bactérias, assim no sobrenadante encontravam-se apenas os fagos.

#### 9.4-Rastreio secundário aos presumíveis positivos obtidos no rastreio primário

Admitindo que um lisado isolado contém  $1 \times 10^6$  pfu/ml, procedemos às diluições necessárias para que, por cada placa de Petri, fossem obtidos cerca de 450 lisados. O procedimento seguido desde a adsorção dos fagos às bactérias, até à extracção dos fagos presumivelmente positivos, das placas de “Petri,” foi o descrito nos pontos de 9.1 a 9.3.

Recolhemos 8 lisados presumivelmente positivos e a sua conservação foi feita em 500µl de SM Buffer suplementado com 20µl de clorofórmio

### 9.5-PCR dos lisados do rastreio secundário e respectivo Southern Blot.

Com o objectivo de avaliarmos os tamanhos dos inserts dos vectores fágicos, presumivelmente positivos, obtidos no rastreio secundário, fizemos o PCR, que se resume na tabela III-4, no qual utilizamos os “Universal primers” T7 e M13.

TUBO	DNA (suspensão de fagos)	dNTPs 10mM	Primers T7, M13 25pmol/μl	Enzima Taq	MgCl <sub>2</sub> 50mM	Buffer 10X
1 até 8	5	1	1+1	0.25	2.5	5
9	-----	1	1+1	0.25	2.5	5
10	5 (plasmídeo com insert PRL.)	1	1+1	0.25	2.5	5

Tabela III-4 - Todas as quantidades referidas são em μl. O tubo 9 serviu de controlo negativo, e o tubo 10 foi o controlo positivo em que utilizamos o plasmídeo clonado referido no ponto 7 da Parte I. Todos os produtos utilizados eram da marca Pharmacia.

O ciclo térmico, repetido 30 vezes, foi o seguinte:

94°C - 1min.

55°C - 1min.

72°C - 2min.

Antes do primeiro ciclo foi feito um “Hot Start” a 94°C por 5min., para completa desnaturação das moléculas de dsDNA e, após o último ciclo, uma terminação de 5min. a 72°C. Os produtos do PCR foram electroforizados, num gel de agarose, 1.5%, suplementado com brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos resultantes da amplificação dos “inserts”, foram avaliados num transiluminador sob luz ultra-violeta.

Com o objectivo de determinarmos quais as bandas que hibridizavam com a sonde de PRL, procedemos ao Southern Blot. O gel foi colocado em solução desnaturante, por 15min. com agitação e lavado 2x 5min. em água estéril. Foi, depois, incubado por 30min, em solução neutralizante, com agitação. Foi feita a montagem para a transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose. Esta membrana antes de ser colocada sobre o gel foi embebida em água destilada e em solução de

transferência, 20xSSC. Passadas 16 horas de transferência, à temperatura ambiente, a membrana foi colocada numa estufa durante 2 horas a 80°C, para a fixação do DNA. Procedeu-se à hibridização do DNA fixado à membrana, com a sonda de PRL. A metodologia e os parâmetros utilizados para marcação da sonda, pré-hibridização, hibridização, lavagens da membrana e autorradiografia, foram iguais aos descritos em 9.2 e 9.3.

Foram reveladas duas autorradiografias, uma ao fim de um dia de exposição e outra ao fim de uma semana de exposição.

#### 9.6 - Excisão do pBluecript SK (-) do vector $\lambda$ ZapII e isolamento dos plasmídeos

Esta excisão *in vivo* permitiu-nos caracterizar e sequenciar o *insert* pretendido num plasmídeo.

A 200  $\mu$ l de células XL1B, obtidas como referido no ponto 6, adicionamos 100  $\mu$ l da suspensão de fagos nº5 obtida no rastreio secundário e 1  $\mu$ l de “ExAssist helper phage”. Após uma incubação de 15min a 37°C, adicionaram-se 3ml de LB e incubou-se 2 horas e 30min à mesma temperatura com agitação. Aquecemos o tubo por 20min a 70°C, para matar as bactérias, e centrifugámo-lo 15min a 4000g. O sobrenadante, contendo o plasmídeo inserido num fago filamentoso, foi transferido para novo tubo. Após a obtenção de *E. coli* estirpe SOLR, com  $DO_{600nm}=1$ , 200  $\mu$ l destas células foram infectadas com 10  $\mu$ l de fagos, a respectiva incubação decorreu a 37°C por 15min. As células foram plaqueadas em LBagar suplementado com ampicilina, numa concentração final de 50  $\mu$ g/ml, e deixadas reproduzirem-se, a 37°C por 16 horas.

Algumas colónias, repicadas das placas de “Pettri” foram crescidas em tubos estéreis, (um clone por tubo), contendo 2ml de meio LB (suplementado com o mesmo antibiótico e na mesma concentração referida, neste ponto). Quando os clones estavam suficientemente crescidos foram feitos “minipreps” conforme descrito no ponto I-5. Uma alíquota foi digerida com as enzimas de restrição SAL I e Bam HI, para posterior

verificação da presença do insert em gel de agarose, metodologia também referida no ponto I-5.

## 10-Sequenciação automática

Recentemente, os marcadores fluorescentes tornaram-se numa alternativa ao uso de radioisótopos, (Bankier and Barrel, in Nucleic acids sequencing). Estes novos marcadores têm grande aplicabilidade na sequenciação automática na qual se provoca a sua excitação por raios laser, sendo a detecção da fluorescência feita opticamente.

Nestes sistemas de sequenciação automática são usados quatro marcadores tendo cada um uma frequência de emissão diferente dos restantes. Realizam-se, segundo o método de Sanger, com Sequenase ou *Taq* DNAP, quatro reacções de terminação onde os quatro tipos de ddNPT estão marcados diferentemente e, por isso, emitem em frequências diferentes. Os produtos das quatro reacções são posteriormente misturados, sendo a mistura electroforizada num único alvéolo do gel.

As cadeias nascentes, marcadas pelo respectivo ddNTP incorporado, são detectadas conforme passam, durante a corrida, por um detector óptico localizado na base do gel. A fluorescência do fragmento mais pequeno é a primeira a ser registada e, a do maior, a última a ser registada.

O sequenciador analisa os sinais detectadas e determina que frequência, ou seja, que base está representada. Em tempo real o aparelho fornece a sequência.

Uma amostra de plasmídeos purificados com concentração de 0.1 µg/µl, referidos no ponto anterior, foi sequenciado num aparelho Biosystems Abiprism versão 2.1.1.

## C-RESULTADOS

### 1-Quantificação do RNAm obtido por cromatografia de afinidade

Pela quantificação, feita sem diluição da amostra de RNAmensageiro, obtivemos os seguintes valores, Tabela III-5.

Abs. 260nm	Abs. 280nm	<i>ratio</i>	concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peso total de RNAm ( $\mu\text{g}$ )
0.081	0.06	1.7	1.2	1.29

Tabela III-5 - Quantificação do RNAmensageiro. A leitura da densidade óptica, que permitiu a avaliação da concentração, foi feita num espectrofotómetro (Pharmacia GeneQuant).

Usamos 98 $\mu\text{g}$  de RNAtotal sendo por isso rendimento, de RNAm, de 1.3%. Consideramos o rendimento obtido satisfatório. A extracção de RNA de pituitárias revela rendimentos inferiores relativamente a outros tecidos.

Em extracções feitas com outros tecidos, nomeadamente, intestino, gónadas, fígado, rins e cérebros, obtivemos rendimentos entre os 3.2 e 3.9%.

O baixo rendimento na purificação de RNAmensageiro de pituitárias, poderá ser devido a dois factores: dificuldade da sua separação de forma intacta, da base do cérebro, após a decapitação do peixe e da abertura da caixa craniana; pequeno tamanho das pituitárias nos peixes. Aspectos que favorecem a ruptura das células e um rápido atingir de temperaturas compatíveis com a degradação do RNA.

## 2-Quantificação da síntese de cDNA

A  $OD_{260nm}$  foi de 0.037 Unidades de Absorvância (UA), numa diluição de 1:60. Considerando que 1UA corresponde, no caso de DNA dupla cadeia, a 50 $\mu$ g/ml, determinamos que a concentração presente na amostra base era de 111 $\mu$ g/ml.

## 3-Título dos bancos BM1 e BM2

A contagem de células lisadas forneceu os seguintes valores, tabela III-6.

Banco	Placa/número de lisados	Título (pfu/ml)
BM1	placa 1 - 0	-----
	placa 2 - 6	$6.0 \times 10^3$
	placa 3 - 157	$1.6 \times 10^4$
BM2	placa 1 - 21	$2.1 \times 10^5$
	placa 2 - 105	$1.0 \times 10^4$
	placa 3 - 763	$7.6 \times 10^4$

Tabela III-6 - Número de lisados e respectivos títulos

Consideramos o título baixo. No total (800 $\mu$ l nos dois bancos), tínhamos cerca de 60000 fagos e esperávamos um título de  $2 \times 10^6$  a  $1.5 \times 10^7$ . O que pode ser consequência de termos utilizado apenas 1.3 $\mu$ g do RNAm para a síntese do cDNA, quando o valor de RNAm se deve situar entre os 1 a 5 $\mu$ g.

## 4-Título do banco ampliado - Bpita

A contagem de células lisadas forneceu os seguintes valores.

Placa (1) Diluição  $10^{-1}$  - lise quase total, não foi possível contar os lisados.

Placa (2) Diluição  $10^{-2}$  - nenhum lisado.

Placa (3) Diluição  $10^{-3}$  - 166 lisados.

Placa (4) Diluição  $10^{-4}$  - 12 lisados.

Em (1), devido ao excesso de fagos não obtivemos lisados individualizados. A ausência de lisados em (2) pode ser explicada pela não homogeneização da diluição, antes da pipetagem dos fagos para a sua incubação com as bactérias, ou pela não adição dos fagos às bactérias.

Para o cálculo do título baseamo-nos apenas nos valores obtidos em (3) e (4), respectivamente,  $1.6 \times 10^8$  pfu/ml e  $1.2 \times 10^8$  pfu/ml.

### 5-Cálculo da percentagem de recombinantes

Foram contados 86 lisados, dos quais 33 azuis e 53 brancos (recombinantes) o que equivale a 62% de recombinantes, i.e. fagos cujo DNA se apresenta clonado. A base deste método encontra-se descrito no ponto 8.

### 6-PCR dos lisados do rastreio secundário e respectivo Southern Blot.

O resultado do PCR permitiu determinar o tamanho dos “inserts” e a pureza dos lisados recolhidos, conforme Figura III-3.

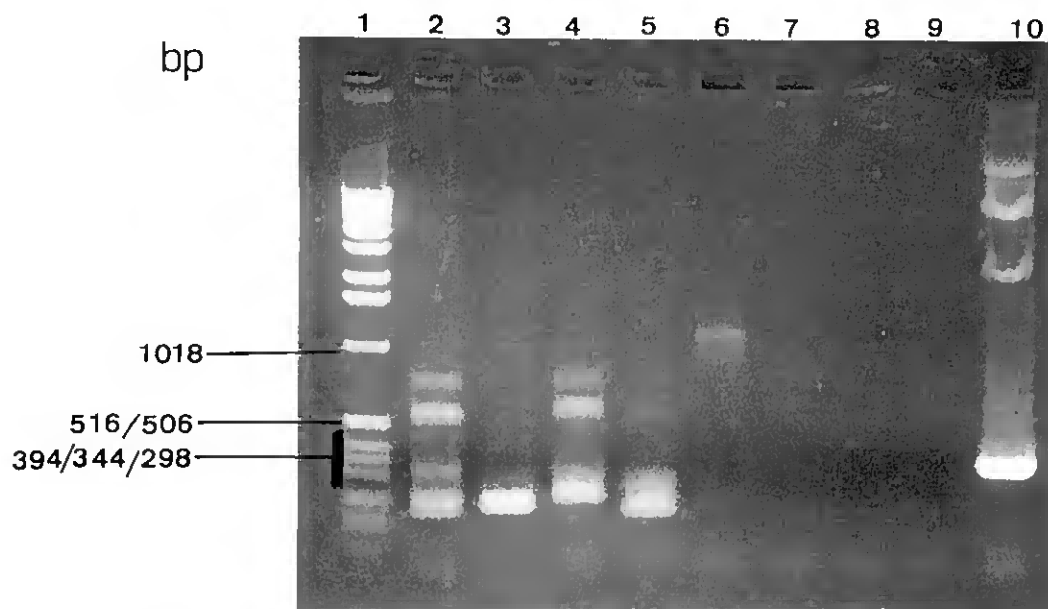


Figura III-3 - Pista 1- Marcador de peso molecular (1 Kb Ladder); Pistas 2 a 8- Lisados, Pista 9- Controlo negativo, Pista 10- Controlo positivo.

Analisando o tamanho das bandas obtidas, neste PCR, verificámos:

- a) Na pista 10 observamos o resultado da amplificação da sonda, obtida por PCR, e clonada no vector pGEM -T (Promega), que mostrou ser cDNA de PRL (Parte I). Nesta pista observa-se as três formas do vector circular, não linearizado. No sentido descendente observamos as formas super-enrolado, enrolado e não enrolado. No final do gel observamos uma banda muito intensa, que corresponde à sonda, concretamente, à banda de cDNA de 361 bp (Parte I).
- b) Os lisados das pistas 2 e 4, necessitam de um rastreio terciário, pois não são puros. As duas bandas superiores a 516bp apresentam, contudo, um tamanho compatível com o nosso objectivo, obter a sequência completa do cDNA da PRL de dourada.
- c) Os lisados das pistas 3 e 5, por apresentarem tamanhos inferiores à sonda, não nos permitiriam atingir o nosso objectivo.
- d) Os lisados das pistas 7 e 8 não apresentam sinal o que deve significar que os lisados foram mal recolhidos a partir das placas de Petri, ou que, eventualmente, o cDNA não estava clonado, pelo que o sinal positivo da autorradiografia da membrana de celulose poderia ser devido a uma hibridização pouco específica e não eliminada durante os processos de lavagem da referida membrana. Poderíamos também pôr a hipótese de alguns *inserts* não serem estáveis.
- e) Na pista 6 observamos a amplificação de um *insert* aparentemente puro e com tamanho superior ao da sonda.
- f) Na pista 9 o controlo negativo não apresenta nenhuma banda amplificada, o que nos leva a concluir que os produtos utilizados, para a elaboração do PCR, não estão contaminados.

## 7-Análise do Southern Blot

Pela análise do Southern Blot verificámos a intensidade da hibridização dos produtos do PCR anterior, com a sonda marcada de PRL, Figuras III-4 e III-4-1.

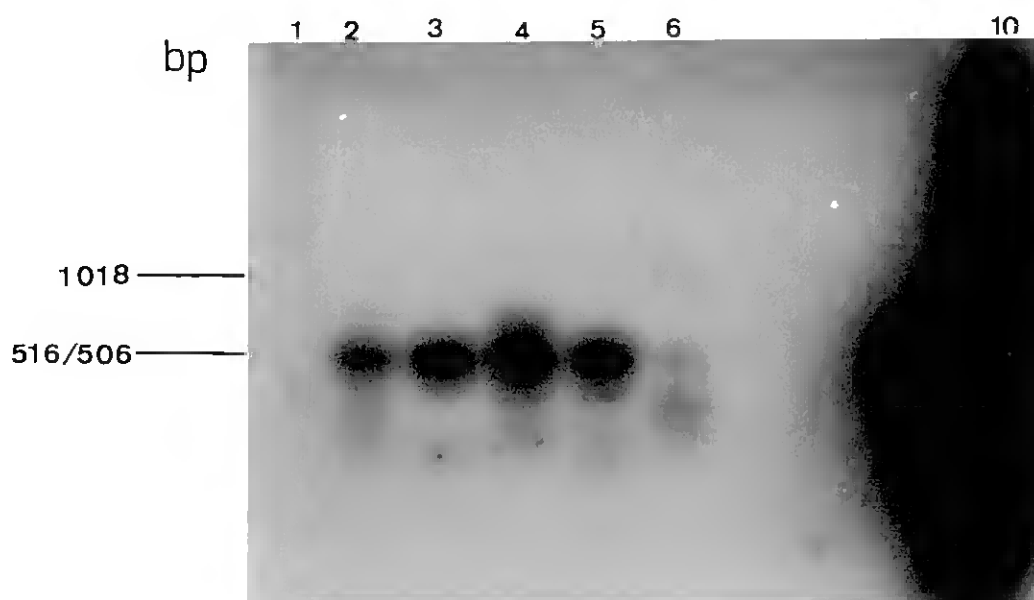


Figura III-4 - Autorradiografia do Southern Blot após um dia de exposição da membrana ao filme. Na pista 1 encontra-se o marcador de peso molecular 1Kb Ladder. Nas pistas 2 a 8 os respectivos lisados. Na pista 9 o controlo negativo e na pista 10 o controlo positivo.

Na pista 10, a intensa mancha de hibridização com a sonda é explicada pela não linearização do vector. Durante o processo de amplificação por PCR foram produzidos fragmentos de diferentes tamanhos que integrando o insert, reagem positivamente com a sonda. Estes fragmentos, com tamanho compreendido entre o vector e o insert, não apresentam concentração suficientemente elevada de forma a serem detectados na fotografia do gel electroforético de separação dos produtos do PCR, Figura III-3. O Southern Blot gera a referida mancha devido à detecção de todos os fragmentos que hibridizam com a sonda e também a alguma difusão do sinal radioactivo.

A análise deste Southern Blot, apenas com um dia de exposição ao filme, indicamos a presença de fragmentos pouco maiores do que a sonda. Como o nosso objectivo é aumentar o conhecimento da sequência já obtida, [fragmento de cDNA de PRL com

361bp, (Parte I)], consideramos que os tamanhos dos fragmentos positivos não serviriam o nosso objectivo. Por isso, e tal como descrito nos métodos, procedemos a uma revelação do mesmo Southern Blot, após uma semana de exposição da membrana ao filme Figura III-4.1.

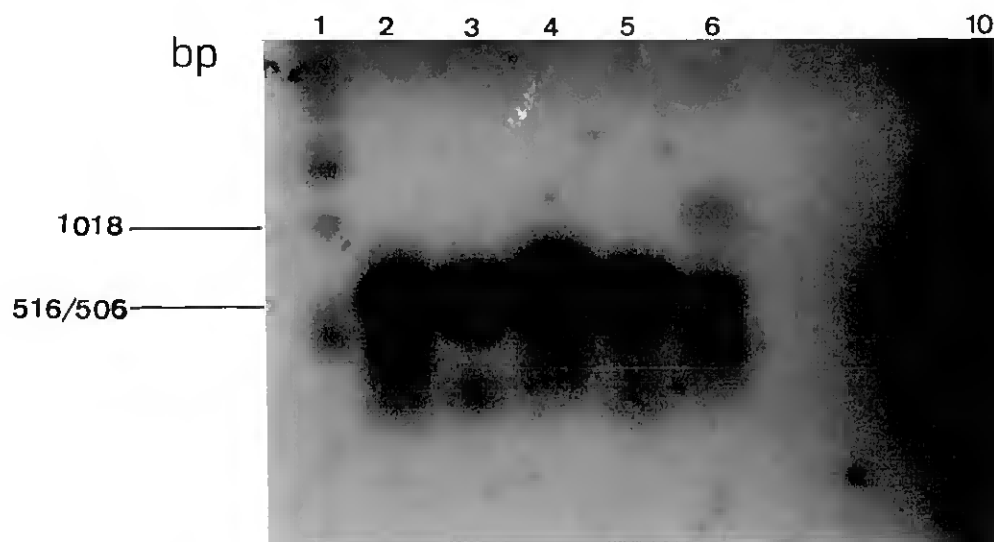


Figura III-4.1 - Autorradiografia após uma semana de exposição da membrana ao filme

Após uma semana de exposição da membrana ao filme, e analisando o resultado, verificamos que as bandas cujo tamanho eram inferiores ao tamanho da sonda (controlo positivo na pista 10), não nos interessavam pois, não nos iriam permitir aumentar a sequência da sonda.

Os lisados das pistas 2 e 4 por não serem puros necessitariam de um rastreio terciário. A banda com um tamanho aproximado a 1000bp, na pista 6, apesar de apresentar um sinal menos forte, do que as outras bandas de menor tamanho, mereceu a nossa atenção, uma vez que, para aumentarmos o conhecimento do fragmento de PRL já sequenciado necessitaríamos de sequenciar um fragmento com tamanho superior à sonda e que simultaneamente hibridizase com ela, o que era observado na referida pista 6. Assim, procedemos à excisão *in vivo* do fragmento da pista 6 (referida

no ponto 10.6 de Métodos desta parte do trabalho) para posterior sequenciação automática.

Séguidamente, procederíamos ao rastreio terciário dos lisados 2 e 4 de forma a obtermos clones puros. Por falta de tempo este rastreio terciário não foi feito de forma a que os resultados constassem deste trabalho.

### 8-Sequenciação automática do *insert* de 1000bp

A sequência obtida, após eliminação das regiões do vector, foi a que se representa na Figura III-5.

5´

GAAAGATGCCCACCACAAGATGGAGATTTTGCTCAAGCTTCTCAAGTGTGACAAAATGACATGCACAG  
 CTGTGCATAAAACATCGAGTGGGCTTTTGAATACGTGTTGTTTGGCTTTAAATAAAATTCCTGGTAGCC  
 CGTCCACTTACAGATATGACCATGCCTCAGGCGGTTGAGCCTCGCTCGCAAAGCAGTACATTCTTTATT  
 GATTGTTTTGGAACACCTTCACACAGAAATAACTTTATATTTCCCTGCACAGTTGTTATTTTAACCTGG  
 CAAAGGCAACAGAGGGCAAACCTCCCAAAGATTATTTGTGTGTCGAGCTGTCAAAAAAATCTACATATC  
 CTGCCATTGATTTCCATTTCCCTTTGTTCTTAACTGGAGTTTGTATTCCTCGCTGGGCTCCTTGCAGTGTT  
 TTGAATTATTTCCCGCGAACCCAGTGAAAACCCCTTTCCAAATNGGAAGCCGGGTTCCCCCTTCC  
 NGCTTTATTTGNAAATTGAACTTTCACTGGAGACGGGGTCAAACAGAGACTCANAACCTTAACTTTGAAT  
 TGTGAAGATGAGTGTGCGAGAGACGGCGAGCGGAACAAATGGCAGTTAAAATTAATTANGTGGCGTTTT  
 TGGTTCCACCCAGGTTTGGATTTGTTGAGTGCTCATGAAAGAGTTGTGNATTTTGCACCTGGCTTAANTN  
 GCCTAATTAAACCTGNATGTAATAACATGCGTTTTATTATTTANTTTAAATGATACACNATTTGGATTTT  
 TATGGCNAGATGATATGNATATGAAATGCATAATGCNAANTTTCCCTTTNTGTANTTTCCCTGGGGGGGG  
 GGTGTAAGTAGNATAGGCCAGTGTGCTGTGNAAATTTTTTTGTCATCNATCACGNATGATTTTTGCCG  
 CTAATAAAGCATGTTGTAG 3´ (Poli A)

Figura III-5 - A sublinhado encontram-se dois sinais de poliadenilação.

O insert que, pela comparação com o marcador de peso molecular 1KB Ladder, aparentava ter 1000bp, tinha de facto 919 bp.

A sequência analisada pelo GenBank, BLAST E-Mail Server (<blast@)ncbi. nlm. nih. gov>), foi identificada como cDNA codificante de Somatolactina (SL) de dourada,

(*Sparus aurata*). A sequência total do mRNA de SL, de dourada (1513 bp), foi obtida por Carlos Pedón e colaboradores da Universidade de Cádiz, e encontra-se disponível no GenBank sob o número de acesso L49205.

Na Figura III-6 encontra-se o alinhamento do fragmento de 919 bp com a sequência de cDNA de SL obtida através do GenBank, ambos de dourada.

```

5'
624 GAGATGCCAC-----AAGATGGAGATTTTGCTCAAGCTTCTCAAGTGTGACAAAATGA
(*)1 GAAAGATGCCACCACAAGATGGAGATTTTGCTCAAGCTTCTCAAGTGTGACAAAATGA

681 CATGCACAGCTGTGCATAAAACATCGAGTGGGGCTTTTGAATACGTGTGTGTTGGCTTGA
61 CATGCACAGCTGTGCATAAAACATCGAGTGGGGCTTTTGAATACGTGTGTGTTGGCTTGA

741 AAATAAATTCCTGGTAGC-GTTCCACTTACAGATATGACCATGCCTCAGGCGGTTTCAGCCT
121 AAATAAATTCCTGGTAGCGGT-CCACTTACAGATATGACCATGCCTCAGGCGGTTTCAGCCT

800 CGCTCGCAAAGCAGTACATTCCTTATTGATGTGTTTTGGAACACCTTCACACAGAAATAAC
180 CGCTCGCAAAGCAGTACATTCCTTATTGATGTGTTTTGGAACACCTTCACACAGAAATAAC

860 TTTATATTTCCCTGCACAGTTCTTATTTTAACTGGACAAGGCAACAGAGGGCAAAGTGG
240 TTTATATTTCCCTGCACAGTTGTATTTTTAACTGGCAAAGGCAACAGAGGGCAAACCTCC

920 AAAAGATTATTTGTGTGTGCGAGCTGTCAAAAAAATCTACATATC-TGCCATTGATTTCCA
300 CAAAGATTATTTGTGTGTGCGAGCTGTCAAAAAAATCTACATATCCTGCCATTGATTTCCA

979 TTTCCCTTTGTCTTAACTGGAGTTTGTATTCCCTCGCTGG-CCTCTGCAGTGTGTTTGA-TT
360 TTTCCCTTTGTCTTAACTGGAGTTTGTATTCCCTCGCTGGGCTCTCTGCAGTGTGTTTGAATT

1037 AITTOCC-GCGA-CCCCAGTGA-CCCCTCTTT-CAAATG-GA-GCOGG-TTTC--
420 AITTOCCCGGAACCCAGTGA AAAACCCCCCTTTCCAAATNGGAAGCOGGTTTCCCC

1088 CTCTCTGCA-TT-ATTG-AAAT-GAAACACTTTTCACTGGAGACGGGAGTCAAACAGAGACT
480 CCTTCCNGCTTTATTGNAAATTTGAAAC--TTTCACTGGAGACGGG-GTCAAACAGAGACT

1144 CACTACTTAACTTTTGA-TTGGTGAAGATGAGTGTGCGAGAGACGGGAGCGGAACAAATG
537 CANAACTTAACTTTTGAATTG-TGAAGATGAGTGTGCGAGAGACGGGAGCGGAACAAATG

```

```

1203 GCAGTTAAAATTAAATTATGIGGCGTTTTTGGTTCCACCCAGGTTTGGATTGTGAGTGC
596 GCAGTTAAAATTAAATTANGTGGCGTTTTTGGTTCCACCCAGGTTTGGATTGTGAGTGC

1263 TCATGAAAGAGCTGTGAATTTTGCAGTGGCTTAACTCGCCTAATTAAACCTGAATGTAAT
656 TCATGAAAGAGTTGTGNATTTTGCAGTGGCTTAAANTGCGCTAATTAAACCTGNATGTAAT

323 AACATGCGTTTTATTATTACITTTAAATGATACACAATTTGGATTTTTTATGGCAAGATGAT
716 AACATGCGTTTTATTATTANITTTAAATGATACACNATTTGGATTTTTTATGCCNAGATGAT

1383 ATGAATATGAAATGCATAATGCAAACTTTTCCTTTTCTGTACTCTCTCTG-----TGT
776 ATGNATATGAAATGCATAATGCNAANITTTTCCTTTTCTGTANTTTCTCTGGGGGGGGTGT

1434 AAGTAGAATAGGCCAGTGTGCTGTGAAAATCTTTTGTGTCATCAATCAGGAATGATTTTA
836 AAGTAGNATAGGCCAGTGTGCTGTGNAATTTTTTGTGTCATCNATCAGNATGATTTTTT

1494 GCCGCTAATAAGCATGTTGTAG 3' (Poli A)
896 GCCGCTAATAAGCATGTTGTAG 3' (Poli A)

```

Figura III-6 - (\*) fragmento de 919 bp, por nós clonado. A similitude verificada é de 92% ao contrário dos 100% esperados. Esta diferença poderá ser explicada pela qualidade do DNA, que interfere com a leitura feita pelo sequenciador automático. No entanto, apesar da leitura da sequência ter sido feita uma só vez, se excluirmos as bases que o sequenciador automático não identificou e, por isso os classificou com a letra N, que segundo o código internacional designa qualquer nucleotídeo, a similitude aumenta para 94%.

No fragmento de 919 bp apenas os nucleotídeos localizados a montante do primeiro sinal de poliadenilação poderão ser codificantes. São eles os primeiros 129 nucleotídeos na extremidade 5'. A proteína madura de SL é codificada pela fração de mRNA correspondente aos nucleotídeos de 76 a 696, da sequência completa fornecida pelo GenBank. Assim a nossa fração de nucleotídeos codificantes, resume-se à expressa na Figura III-7.

```

5'
624 GAAAGATGCCAC---AAGATGGAGATTTTGCTCAAGCTTCTCAAGTGTGACAAAATGA
(*) 1 GAAAGATGCCACCACAAAGATGGAGATTTTGCTCAAGCTTCTCAAGTGTGACAAAATGA

681 CATGCACAGCTGTGCGATAAAAACATCGAGTGCGGGCTTTTGAATACGTGTTGTTTGGCTTIA
61 CATGCACAGCTGTGCATAAAAACATCGAGTGCGGGCTTTTGAATACGTGTTGTTTGGCTTIA

741 AATAAA      3'
121 AATAAA      3'

```

Figura III-7 - Fracção do fragmento 919 bp. (\*), potencialmente codificante alinhado com a sequência recebida do GenBank.

Feita a tradução das sequências dos nucleotídeos codificantes, seguindo a segunda pauta de leitura, do nosso fragmento obtivemos o seguinte polipeptídeo, Figura III-8.

```

5' G AAA GAT GCC CAC CAC AAG ATG GAG ATT TTG CTC AAG CTT CTC AAG TGT
   K  D  A  H  H  K  M  E  I  L  L  K  L  L  K  C

CGA CAA AAT GAC ATG CAC AGC TGT GCA TAAAACATCGAGTGCGGGCTTTTGAATACG
R  Q  N  D  M  H  S  C  A

TGTTGTTTGGCTTTAATAAA      3'

```

Figura III-8 - Tradução da região codificante do fragmento 919 bp. Os aminoácidos estão no código de uma letra. O sublinhado identifica o 1º sinal de poliadenilação.

O alinhamento entre os dois polipeptídeos correspondentes (tradução do fragmento de 919 bp e, a equivalente proteína) encontra-se na Figura III-9, no código de uma letra.

```

(1) K D A H - K M E I L L K L L K C R Q N D M H S C R
(2) K D A H H K M E I L L K L L K C R Q N D M H S C A

```

Figura III-9 - Alinhamento entre os polipeptídeos de SL correspondentes à região codificante do fragmento de SL por nós clonado. Em (1) a sequência fornecida pelo GenBank, em (2) a sequência por nós obtida. Em 25 aminoácidos, 23 são iguais, a homologia é de 92%. No entanto, como a nossa sequenciação foi feita apenas uma vez, se excluirmos o aminoácido histidina (H), que não alinha, a homologia sobe para 96%.

**DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

A sequência de 361bp de PRL de dourada, de acordo com os alinhamentos feitos pelo banco de dados do GenBank, apresenta em média uma homologia de 59-78% com outras espécies de peixes, pertencentes a Famílias diferentes da de dourada, referidos na Tabela I-7 de Resultados da Parte I, valor comparável ao sugerido por Chang *et al.* (1992) que apontam uma média de 64 a 74% para o mesmo tipo de homologia.

O alinhamento do fragmento de PRL de dourada, com a PRL de peixes de outras Famílias, Figura D1, permite verificar uma maior homologia na região conservada D, na zona C-terminal. Todos os aminoácidos coincidentes, não necessariamente com as cinco sequências, estão a negro.

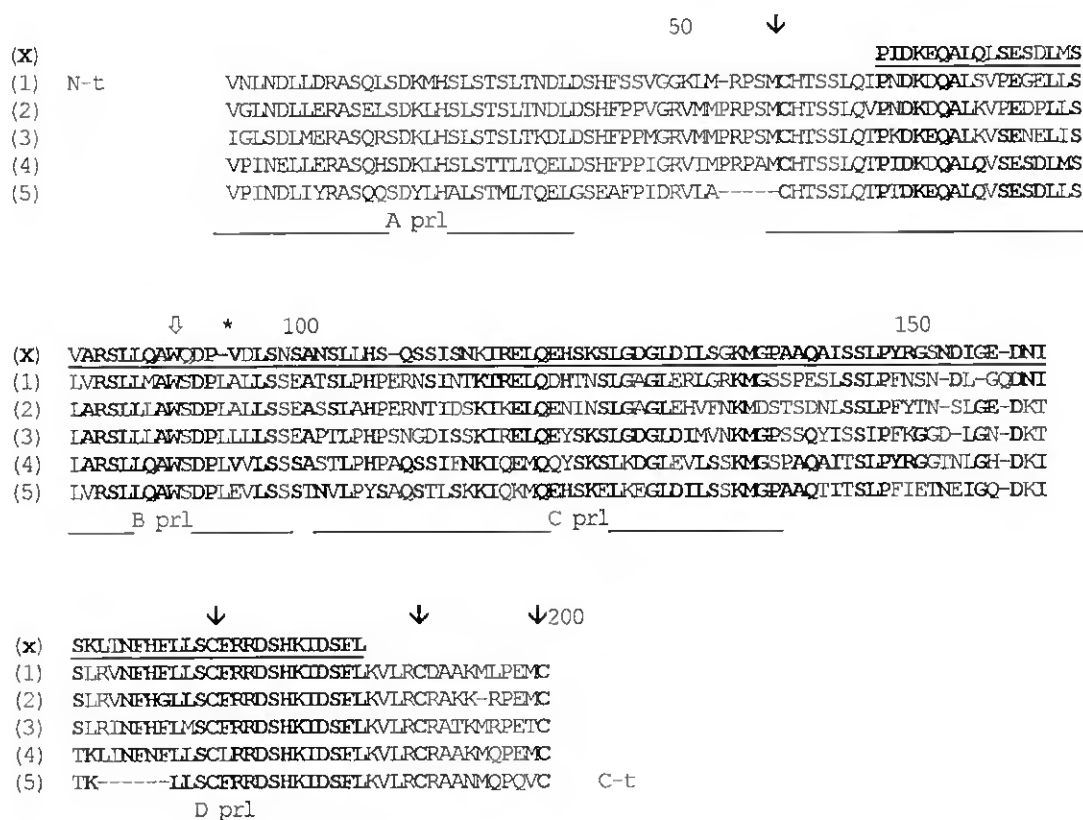


Figura D1 - Alinhamento de parte da sequência de PRL de dourada, por nós obtida (x), com a PRL de: (1)-peixe-gato, (2)-carpa, (3)-"chum salmon", (4)-tilápia I, (5)-tilápia II. De notar o igual posicionamento dos resíduos de cisteína assinaladas por setas. (↓) As regiões de A a D referem-se a regiões conservadas. Foram criados espaços em algumas sequências de forma a aumentar o grau de homologia. A seta larga, (⇓), indica o triptofano no locus 91, característico da PRL. (N-t: Terminal amina, C-t: Terminal carboxílico) (Os alinhamentos de (1) a (5) foram extraídos de Chen *et al.*, 1994 in Fish Physiology, Vol. XIII)

Em relação aos tetrápodes obtivemos um grau de homologia entre os 41 e 49%, (Tabela I-8, Resultados da Parte I), e os mesmos autores preconizam uma homologia entre 38 e 35%. Esta diferença poderá ser explicada por não termos a sequência completa de PRL, falta uma zona de 43 resíduos se aminoácidos na região N-terminal e de 15 na região C-terminal. Na Figura D2 representa-se o alinhamento do fragmento de PRL de dourada e a PRL de representantes das quatro classes de tetrápodes: anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

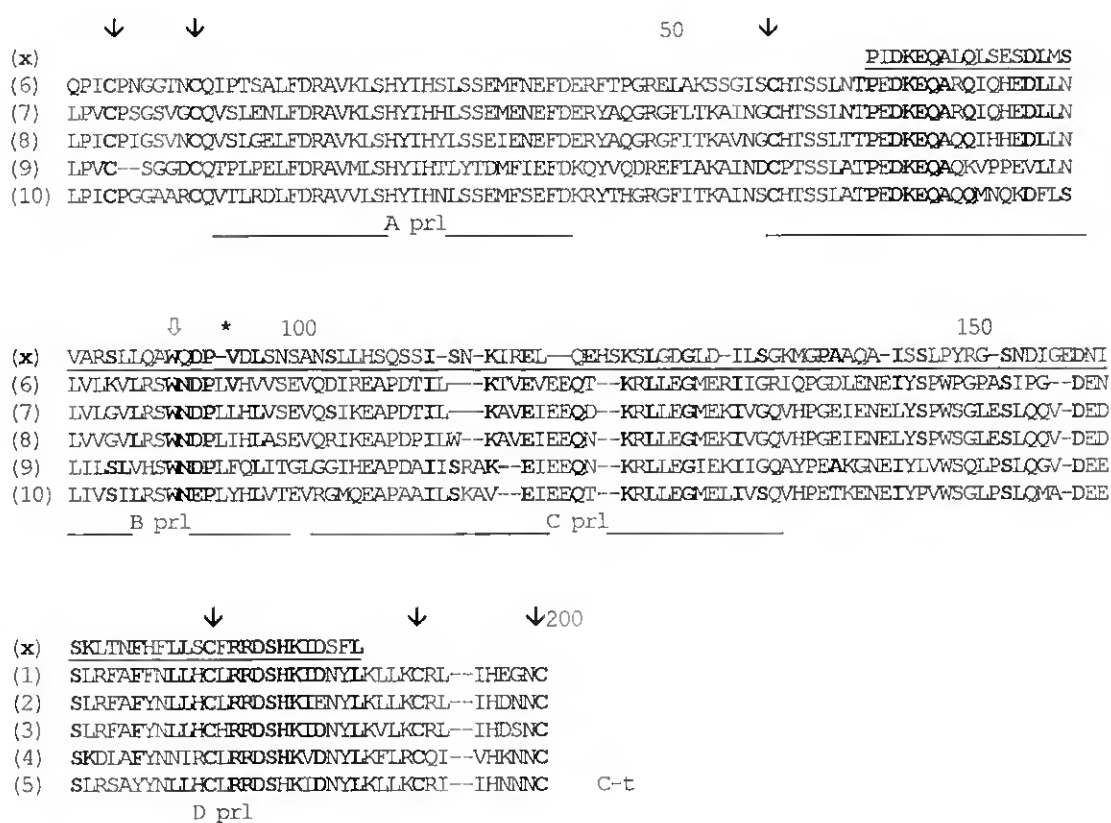


Figura D2 - Alinhamento do fragmento de PRL de dourada, (x), com a de alguns tetrápodes. (1)-rã-touro, (2)-tartaruga-marinha, (3)-galinha, (4)-rato, (5)-homem. Todos os resíduos de aminoácidos com algum alinhamento estão a negrito e os de cisteína, assinaladas por setas, (↓). As regiões de **A a D** referem-se a regiões conservadas. Foram criados espaços em algumas sequências de forma a aumentar o grau de homologia. A seta larga, (⇓), indica o triptofano no locus 91, característico da PRL. (C-t: Terminal carboxílico) (Os alinhamentos de (1) a (5) foram adaptados de Yasuda *et al.*, 1991 e de, Chen *et al.*, 1994 in Fish Physiology, Vol. XIII)

A grande conservação observada na região D da PRL de dourada confirma o proposto por Nicoll, *et al.* (in Yasuda, 1991). Esta região seria uma das que têm função na ligação da hormona ao receptor. De facto, estudos de mutações dirigidas, (Cunningham, *et al.*, 1990), efectuados na região D, alteram a afinidade da PRL pelo seu receptor.

Comparámos, também, o fragmento de proteína de PRL de dourada com a proteína GH, Figura D3, na qual todos os resíduos de aminoácidos com alguma coincidência estão a negrito.

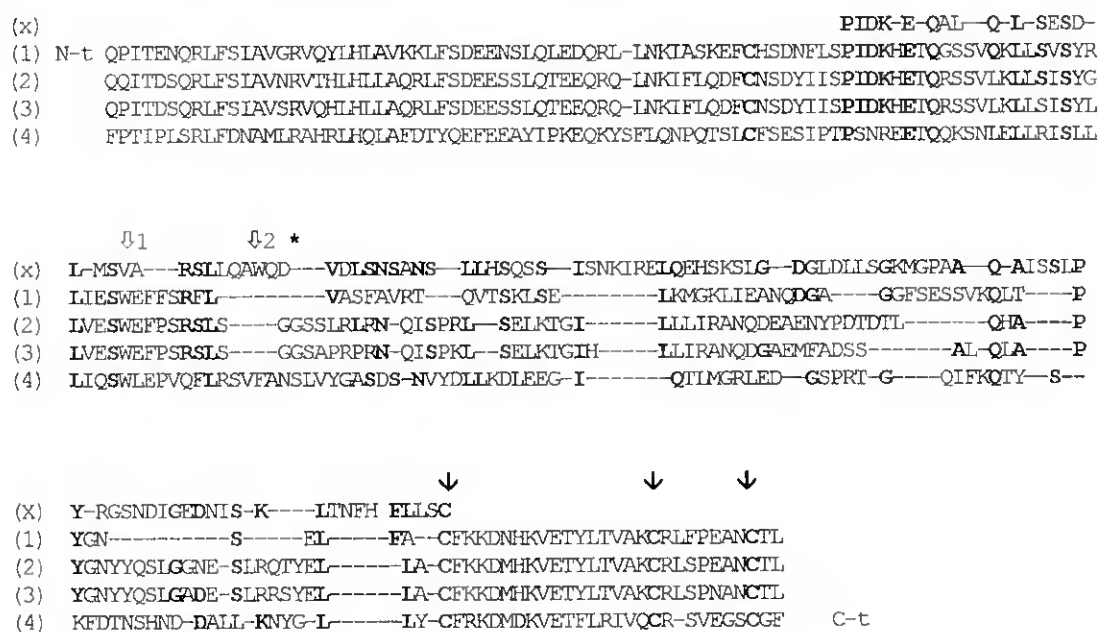


Figura D3 - Alinhamento entre PRL de dourada (x) e GH de: (1)-linguado, (2)-tilápia, (3)-atum, (4)-homem. Todos os resíduos de aminoácidos comuns estão em negrito e os de Cys indicados por setas. (↓). Os espaços criados têm a função de aumentar o grau de homologia. (↓1-resíduo de triptofano de GH que identifica a posição 85; ↓2-resíduo de tryptofano de PRL que identifica a posição 91; N-t: Terminal amina, C-t: Terminal carboxílico).

O cálculo da homologia forneceu os seguintes valores:

PRL de dourada/GH de linguado.....26%  
 PRL de dourada/GH de tilápia.....29%  
 PRL de dourada/GH de atum.....29%  
 PRL de dourada/GH de homem.....23%

Estes valores, ainda que superiores, têm uma ordem de grandeza semelhante ao referido por Ono, (1994): 24% de homologia entre PRL e GH.

Na sequência de PRL de dourada, por nós obtida, o tripleto do cDNA correspondente ao aminoácido 95 assinalado nas figuras D1, D2 e D3 pelo asterisco, (\*), é de terminação-TAG. Segundo Newton (1995), a enzima Taq DNApolimerase introduz erros durante o crescimento dos *primers*. Uma troca de bases poderia ter originado aquele tripleto de terminação. Uma outra possibilidade, justificativa deste erro, seria a acção da enzima transcriptase reversa, aquando da síntese do cDNA. Apesar deste erro, a ribossonda mostrou-se específica para a detecção do RNAm de PRL, quando usada em hibridização *in situ*, conforme a análise feita aos resultados da Parte II.

Como referido em Resultados da Parte III, a similitude entre o fragmento de 919 bp de Somatolactina por nós clonado e o equivalente clonado por Carlos Pedón, é de 96%, e não de 100%. Esta diferença, pode ser devida à qualidade do nosso DNA e ao facto de a sequenciação automática ter sido feita uma única vez.

Ainda que a média de similitude entre SL, PRL e GH seja de 24%, (Ono, *et al* 1990), foi-nos possível detectar um clone de SL de dourada, num banco de cDNA de pituitária, com uma sonda de PRL da mesma espécie. Apesar da sonda de PRL em hibridização *in situ* ter mostrado especificidade pois não hibridizou com RNAm localizado na *pars intermedia*, onde se situam as células produtoras de SL, quando usada no rastreio do banco de cDNA de pituitária de dourada hibridizou, fracamente, com um clone de SL. Esta aparente contradição pode ser explicada pela diferente estringência usada nos dois métodos.

Em hibridização *in situ* utilizamos uma temperatura de 55°C, para a hibridização da sonda e nas lavagens, para eliminação dos híbridos imperfeitos, 58°C em 2xSSC. No rastreio do banco a hibridização das membranas foi feita também a 55°C mas as lavagens foram feitas a 50°C em 4xSSC. Quanto mais alta a temperatura maior a dificuldade da manutenção dos híbridos não específicos. Como a eliminação dos híbridos imperfeitos, nas membranas do rastreio do banco, foi feita a uma temperatura inferior à utilizada nas lavagens dos cortes histológicos, é admissível a manutenção de híbridos menos

específicos nas membranas de nitrocelulose. De facto, a hibridização entre a sonda de PRL e o fragmento de SL é fraca conforme se verifica no sinal obtido no Southern Blot.

A similitude de 24% entre os cDNAs de GH, PRL e SL parece ser suficiente para a detecção de clones de SL com sondas de PRL e de GH, uma vez que, Pedón *et al.* (1994), usando uma sonda de GH de linguado, extraíram, de um banco de cDNA de pituitária de solha, (*Solea senegalensis*), a sequência da somatolactina.

O fragmento de SL apresenta na região 5' uma ORF (pauta de leitura codificante) de 76 bp e uma região não codificante em 3' de 843bp, com dois sinais consenso de poliadenilação: AATAAA, conforme Figura III-6 em Resultados da Parte III.

A poliadenilação alternativa é também observada no cDNA da SL de “chum salmon”, com três sinais de poliadenilação e de linguado com dois sinais. No entanto o cDNA de bacalhau apresenta apenas um sinal, Figura D-4.

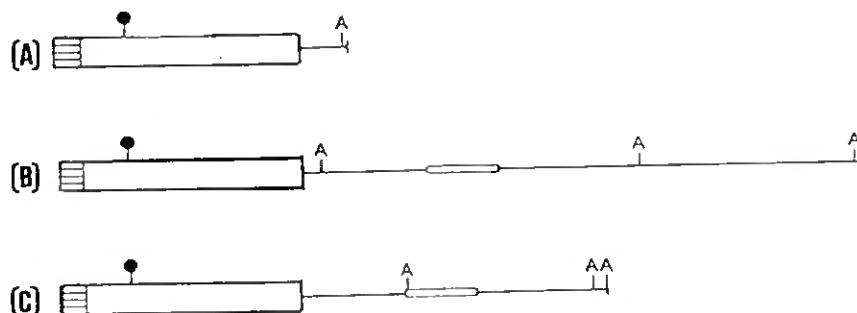


Figura D-4 - Estrutura do cDNA de (A)-bacalhau; (B)-“chum salmon” e (C)-linguado. Os rectângulos largos representam a região codificante da SL, sendo a região a tracejado indicadora do peptídeo sinal de 24 a 26 aminoácidos. Os rectângulos finos indicam regiões conservadas não codificantes. A-sinal de poliadenilação e ● localização do aminoácido Cys diagnosticante de SL. Enquanto o cDNA de bacalhau tem um único sinal de Poliadenilação, os de “chum salmon” e linguado têm três e dois sinais respectivamente. (Adaptado de Takayama, *et al.*, 1991 in Fish Physiology, Vol.XIII)

A região ORF de 76 bp após tradução origina um peptídeo de 25 aminoácidos. O alinhamento, desta fracção de proteína de SL, com as equivalentes regiões das proteínas de SL de linguado, bacalhau e salmão, encontra-se representado na Figura D-5.

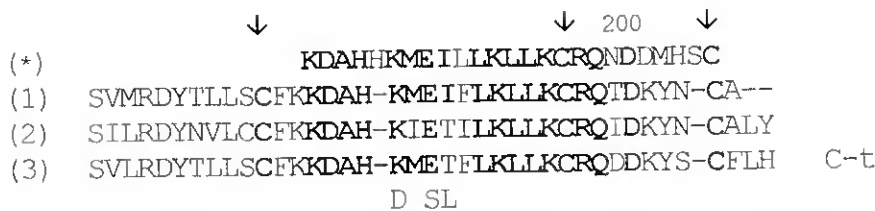


Figura D-5 - Alinhamento da tradução da ORF do cDNA (919bp) de SL de dourada, (\*) com a fracção equivalente de SL de: (1)-linguado, (2)-bacalhau, (3)-salmão. Os resíduos coincidentes estão a negrito e os de cisteína, assinalados com setas. (↓). O nosso polipeptídeo alinha na a 4ª região conservada, região D. (C-t: Terminal carboxílico) (As sequências (1), (2) e (3) foram adaptadas de Chen *et al.* in Fish Physiology, Vol. XIII, 1994)

O grau de homologia resultante deste alinhamento é de 72% entre dourada e linguado e de 64% entre dourada/bacalhau e dourada/salmão. Este valor é baixo quando comparado com os 78% entre as SL de bacalhau e linguado (Ono *et al.*, 1990). Esta diferença pode ser devida ao pequeno tamanho da SL de dourada, apesar de alinhar numa região conservada.

Ao compararmos a região conservada no C-terminal de SL de dourada com as GH e PRL de peixes, Figura D6, verificamos que o grau de homologia está de acordo em relação aos alinhamentos publicados.



Figura D6 - Alinhamento de uma parte da sequência de aminoácidos das hormonas SL, GH e PRL: (\*) SL de dourada por nós clonado, (1)-SL de linguado, (2)-GH de linguado, (3)-GH de "chum salmon", (4)-PRL de "chum salmon", (5)-PRL de carpa. A numeração dos aminoácidos foi baseada na proteína SL madura de linguado, introduziram-se deleções de modo a maximizar a homologia. Os aminoácidos comuns estão em negrito e os resíduos de cisteína, estão indicados por setas, (↓). (C-t: Terminal carboxílico) (as sequências se (1) a (5) foram adaptadas de Ono *et al.*, 1990)

A proteína SL de dourada é constituída por 206 resíduos de aminoácidos, apresentando o nosso fragmento os últimos 24 resíduos de C-terminal. Apesar de alinharmos apenas 24, de 206, resíduos de aminoácidos, e destes 24 apenas 6 coincidirem na totalidade, encontramos uma homologia de 25%. Este valor está de acordo com Ono (1994) in Fish Fysiology, que refere uma média de homologia de 24%, entre GH, PRL e SL, porque, conforme se observa na Figura 9 do ponto 6 da Introdução, os resíduos de aminoácidos coincidentes estão dispersos ao longo do alinhamento sendo a zona de maior homologia a C-terminal.

**PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## Perspectivas futuras

Os estudos de estrutura e função da PRL sugerem que a sua evolução se fez em dois troncos: um tronco para os teleósteos e outro para os tetrápodes, (Kawauchi and Yasuda, 1988, 1989, in Yasuda *et al.*, 1991). Há poucos estudos sobre a PRL em peixes, ao contrário da GH que, pela sua acção no crescimento, apresenta maior aplicabilidade em aquacultura. Seria contudo interessante investigar a estrutura/função da PRL em vertebrados mais primitivos, de forma a determinar a possível sequência que esteve na base evolutiva da actual PRL de teleósteos e tetrápodes, o que permitiria confirmar/alterar cladogramas propostos para a evolução desta hormona. Para tais estudos a sonda que produzimos poderia ter aplicabilidade.

A sonda poderia, também, ser utilizada para aumentar o conhecimento da PRL em relação à localização das suas células alvo, e das células que a expressam. Em rato foram detectadas formas de PRL, no cérebro e cerebelo, (Emanuele, *et al.* 1987) e células hipotalâmicas que a expressam, (Schachter, *et al.* 1984, in Emanuele, *et al.* 1987).

Utilizamos a sonda num banco de cDNA, mas a sua utilização num banco de DNA poderia permitir o conhecimento do gene, contribuindo para o conhecimento do controlo da PRL em dourada.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Bankier, A. T. and Barrel, B. G.** (1989) Sequencing single-strand DNA using the chain-termination method in *Nucleic Acids Sequencing, a practical approach*, Edt. C. J. Howe and, E. S. Ward, IRL PRESS Oxford University Press
- Bentley, P. J.** (1982) *Comparative Vertebrate Endocrinology*, 2nd Ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Bolton, J. P., Collie, N.L., Kawauchi, H. and Hirano, T.** (1987) Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *J. Endocr.*, 112,63-68
- Campbell, A. K.** (1990) *Peptide Hormone Secretion A Practical Approach*, Ed. K. Siddle and J. C. Hutton, IRL PRESS, Oxford.
- Chang, Y. S., Huang, F. L. and Lo, T. B.** (1992) Molecular cloning of carp and bighead carp prolactin, *General. and Comparative Endocrinology*, 87,260-265
- Chen, T. T., Marsh, A., Shambloott, M., Chan, K.-M., Tang, Y.-L., Cheng, C. M., and Yang, B.-Y.** (1994) Structure and evolution of fish growth hormone and insulinlike growth factors genes, in *Fish Physiology*, Vol. XIII, Hoar, W., Farrel. A. P., and Randall, D. Eds., Academic Press Inc.
- Chester-Jones, I. Ingleton, P. M., and Phillips, J. G.** (1987) *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*, Plenum Press, New York
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction, *Anal. Biochemistry*, 162,156-159
- Clackson, T.** (1993) Primer Design, in *PCR A Practical Approach*, Ed. M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor, IRL PRESS, Oxford University Press

**Compton, T.** (1990) Degenerate Primers for DNA Amplification, in *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*, Ed, Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky and Thomas J. White, Academic Press, Inc.

**Cunningham, B. C., Henner, D. J., and Wells, J. A.** (1990) Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor, *Science*, 247, 1461-1465

**Dardenne, M., Moraes, M: C: L., Kelly, A. and Gagnerault, M.-C.** (1994) Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analysed by Flow Cytofluorometry, *Endocr.*, 134, 2108-2114

**Doliana, R.; Bortolussi, and M Colombo, L.** (1992) Cloning and sequencing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) growth hormone cDNA using polymerase chain reaction and degenerate oligonucleotides, *DNA Sequence-J. DNA Sequencing and Mapping*, 3: 185-189

**Doliana, R.; Argentini, C.; Segat D; Santarossa, P.; Mucigat, M. T.; Colombo, L.; and Bortolussi, M.** (1994) The prolactin of european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cloning of cDNA and efficient expression in *Escherichia coli*, *Biochemistry and molecular Biology international*, 33, 1117-1126

**Ellis L A., and Picciano, M. F.** (1995) Bioactive and immunoreactive prolactin variants in human milk, *Endocr.* 136, 2711-2720

**Emanuele, N. V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T. C., Beer, C. T., Martinson, D., Gout, P. W., Kirsteins, L., and Lawrence, A. M.** (1987) Extrahypothalamic brain prolactin: evidence for independence from pituitary prolactin, *Brain Research*, 421, 255-262

**Evans, D. H.** (1993) *Physiology of Fishes*, CRC Press, Florida

**Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., and Martial, J. A.** (1996) Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals, *Endocr. Reviews Vol. 17, n°4*

- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. and Gelbart, W. M.** (1993) *An Introduction to Genetic Analysis*, 5th Edition, Ed. W. H. Freeman and Company, New York
- Hadley, E. Mac,** *Endocrinology* third edition, Ed. Prentice-Hall Internacional, Inc.
- Hirano, T.** (1986), The endocrine system, *Fish Physiology*, Vol II, Hoar, W., and Randall, D. Eds., Academic Press Inc.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirano, T.** (1993) Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by low environmental calcium, *Gen. And Comp. Endoc.*, 91, 298-306
- Kawauchi, H., Yasuda, A. and Rand-Weaver.** (1990) Evolution of prolactin and growth hormone family, *Progress in Comp. Endocr.*, 343, 47-53
- Li, W.-H. and Graur, D.** (1991) *Fundamentals of Molecular Evolution*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Mershon, J., Sall, W., Mitchner, N. and Bem-Jonathan, N.** (1995) Prolactin is a local growth factor in rat mammary tumors, *Endocr.*, 136, 3619-3623
- Morley, M.** (1981) The effect of prolactin on water absorption by the intestine of the trout (*Salmo gairdneri*), *Gen. and Compar. Endocr.*, 44, 64-68
- Newton, C. R.** (1995) Primers in *PCR Essential Data*. Ed. C. R. Newton, Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, UK
- Nishioka, R. S., Jesus. E., and Hyodo, S.** (1993) Localization of mRNAs for a pair of prolactins and growth hormone in the tilapia pituitary using *in situ* hybridization with oligonucleotides probes, *Gener. and Compar. Endocr.*, 89, 72-81

- Noso, T., Swanson, P., Lance, V.A., and Kawauchi, H.** (1992) Isolation and characterization of glycosylated and non-glycosylated prolactins from alligator and crocodile, *Int. J Peptide Protein Res.*, 39, 250-257
- Ogawa, M., Yagasaki, M., and Yamazaki, J.** (1973) The effect of Prolactin on water influx in isolated gills of the goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44<sup>A</sup>, 1177-1183
- Oliverieu, M., Oliverieu, J. M. and Amir, C.** (1981) Specific effect of calcium ions on the calcium-sensitive cells of the pars-intermedia in the gold-fish. *Cell Tissue Res.*, 214, 32-31
- Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, T., and Kawauchi, H.** (1990) cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4330-4334
- Ono, M.**(1994) The somatolactin gene in *Fish Physiology*, Hoar, W. S., Farrel, A. P., and Randall, J. D., Vol XIII, Academic Press, Inc.
- Pendón, C., Martínez-Barberá, J. P., and Valdivia, M. M.** (1994) Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea senegalensis*), *Gene*, 147, 227-230
- Peters, P.** (1993) *Biotechnology, A guide to Genetic Engineering*, Wm. C. Brown Communications, Inc, EUA
- Power, D. M. and Canário, A.** (1992) Immunocytochemistry of somatotrophs, gonadotrophs, prolactin and adrenocorticotropin cells in larval seabream (*Sparus aurata*) pituitaries, *Cell Tissue Res.*, 269, 341-346
- Power, D. M., Canário, A. and Ingleton, P.** (1994) A Família da hormona de crescimento em peixes, *Boletim de Biotecnologia*, 49, 28-32
- Power, D. M., Canário, A. and Ingleton, P.** (1996) Somatotropin releasing-inhibiting factor and galanin innervation in the hypothalamus and pituitary of seabream (*Sparus aurata*), *General and Comparative Endocrinology*, 101:264-274

- Prack M.** (1980) Seasonal effects of prolactin on aspects of carbohydrate and lipid metabolism in the goldfish, (*Carassius auratus*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 65<sup>A</sup>, 337-342
- Prunet, P., Avella, M., Fostier, A., Bjornsson, T. B., Boeuf, G., and Haux, C.** (1990) Roles of prolactin in salmonids, *Progress in Compar. Endocr.*, 342, 547-552
- Rand-Weaver, Noso, T., Muramoto, K., and Kawauchi, H.** (1991) Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from atlantic cod (*Gadus morhua*) Pituitary Glands, 30, 1509-1515
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T. G. and Sumpter J. P.** (1995) Pronounced seasonal rhythms in plasma somatolactin levels in rainbow trout, *Journal of Endocrinology*, 146, 113-119
- Rentier-Delarue, F., Swennen, D. Mercier, L., Lion, M., Benrubi, O., and Martial, J. A.** (1989) Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of GH-II by *Escherichia coli*, *DNA*, 8, 109-117
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA
- Scharfmann R.** (1994) Growth hormone and prolactin regulate the expression of nerve growth factor receptors in INS-1 Cells, *Endocr.* 134, 2321-2328
- Strickberger, M. W.**, Evolution (1990) Ed. Sales, and Customer, Service Offices, Boston
- Suzuki, R.** (1991) Isolation and characterization of japanese eel prolactins, *Gen. and Comp. Endocr.*, 81, 391-402
- Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. and Ono, M.** (1991) in *Fish Physiology*, Vol XIII Ed. Hoar, W. S., Farrel, A. P., and Randall, J. D., Academic Press, Inc.

- Utida, S., Hirano, T., Ando, M., Johnson, D. W. and Bern, H. A. (1972)**  
Hormonal control of the intestine and urinary bladder in teleost osmoregulation, *Gen. Comp. Endocr. Suppl.* 3, 317-327
- Watson, J. D., Gilman, M. G., Witkowski, J. and Zoller, M. (1996)**  
*Recombinant DNA*, 2nd edition, Ed. Scientific American Books
- Wendelaar-Bonga and Pang (1991)** The endocrine system, in *Fish Physiology*, Vol II, Hoar, W., and Randall, D. Eds., Academic Press Inc.
- Wendelaar-Bonga, S., E., (1993)** Endocrinology in *The Physiology of Fishes*, Ed. David H. Evans, CRC Press Inc.
- Yasuda, A., Yamaguchi, K., Kobayashi, T., Yamamoto, K., Kikuyama, S., and Kawauchi, H., (1991)** The complete amino acid sequence of prolactin from the bullfrog, *Rana catesbeiana*, *General and Comp. Endoc.*, 83, 218-226
- Zhu, Y. and Thomas, P. (1995)** Red Drum somatolactin: development of a homologous radioimmunoassay and plasma level after exposure to stressors or various backgrounds, *Gener. Compar. Endoc.* 99, 275-288

