

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia parasitária**

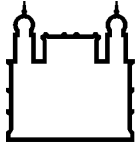
**ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX  
HUMANO: UM GENE COM EXPRESSÃO ALTERADA NA  
INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae***

**SABRINA DA SILVA SANTOS**

**Rio de Janeiro**

**2006**

**ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX  
HUMANO: UM GENE COM EXPRESSÃO ALTERADA NA  
INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae***



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia parasitária**

**ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX  
HUMANO: UM GENE COM EXPRESSÃO ALTERADA NA  
INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae***

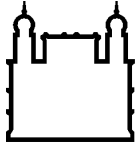
**SABRINA DA SILVA SANTOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

**Orientadores: Antonio Jorge Tempone**  
**Maria Cristina Vidal Pessolani**

**Rio de Janeiro**

**2006**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia parasitária**

**ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX  
HUMANO: UM GENE COM EXPRESSÃO ALTERADA NA  
INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae***

**SABRINA DA SILVA SANTOS**

**Orientadores: Antonio Jorge Tempone**  
**Maria Cristina Vidal Pessolani**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Milton Ozório Moraes - Presidente**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr. Philip Noel Suffys**  
**Prof. Dr. Franklin David Rumjanek**

Dissertação defendida e aprovada em 19 de abril de 2006.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Sabrina da Silva

Estudo da região promotora do gene PHEX humano: um gene com expressão alterada na infecção pelo *Mycobacterium leprae*. / Sabrina da Silva Santos. – Rio de Janeiro: 2006.

70 p.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2006.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. PHEX. 4. Caracterização de promotores. I. Estudo da região promotora do gene PHEX humano: um gene com expressão alterada na infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

*Não é a força do vento, mas a  
disposição das velas que determina  
o caminho a seguir.*

Autor desconhecido

## AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Ao meu marido Rodrigo, pelo amor, amizade e companheirismo em todos os momentos da realização deste trabalho.
- Aos meus pais, por todo amor e incentivo.
- Ao Dr. Antonio Jorge Tempone, pela orientação deste trabalho. Agradeço a oportunidade de ter realizado este projeto.
- À Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, pela orientação e por toda dedicação a todos os trabalhos realizados no laboratório.
- Aos companheiros e amigos de laboratório: Júlio (por sua grande contribuição neste trabalho e amizade); Patrícia (por tornar as horas no laboratório mais divertidas); Cristiana, Luciana, Elisa, Michelle Lopes, Michelle Portugal, Lucinéia, Renata, Érika, Elza, Leonardo, Adriano, Renato e Luís Afonso.
- À todos os amigos do departamento: Milton (por todo incentivo desde a seleção para o mestrado), Viviane, Alejandra, Guilherme, Patrícia, Valcemir, Sérgio, Tatiana Fulco, Tatiana, Harrison, Danuza, Marjorie, Amanda, Íris, Geraldo e Sr Sales (por cuidar com tanto carinho de todos nós).
- À amiga Cynthia, por fazer parte desta história desde o início. Obrigada pela amizade e pelo companheirismo.
- Aos professores do curso de pós-graduação.
- Ao Cnpq pelo financiamento deste projeto através da bolsa de Mestrado.
- A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>FIGURA 1:</b> Taxas de prevalência da hanseníase no Brasil em dezembro de 2004.	<b>4</b>
<b>FIGURA 2:</b> Estrutura do gene e da proteína PHEX.	<b>11</b>
<b>FIGURA 3:</b> Mapa do Vetor pGL3-Basic.	<b>27</b>
<b>FIGURA 4:</b> Mapa do Vetor pGL3-Control.	<b>28</b>
<b>FIGURA 5:</b> Mapa do Vetor pRL-TK.	<b>29</b>
<b>FIGURA 6:</b> Resultado da análise do fragmento de 4498 bp através do programa Genomatrix Eldorado 3.0.2.	<b>32</b>
<b>FIGURA 7:</b> Resultado da análise do fragmento de 4498 bp através do programa Genomatrix Eldorado 3.0.2, representado de forma esquemática.	<b>35</b>
<b>FIGURA 8:</b> Resultado do alinhamento da região de 1046 bp do gene PHEX humano (hs2984) e de parte da seqüência do gene PHEX de rato (rn20637) com o promotor murino (mm90141) utilizando o programa DiAlign.	<b>37</b>
<b>FIGURA 9:</b> Amplificação de diferentes fragmentos da provável região promotora do gene PHEX.	<b>41</b>
<b>FIGURA 10:</b> Amplificação do fragmento de 1046 nucleotídeos e a do fragmento -500 com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição.	<b>42</b>
<b>FIGURA 11:</b> Confirmação do tamanho dos vetores obtidos após miniprep.	<b>43</b>
<b>FIGURA 12:</b> Digestão e Purificação dos fragmentos 1046 e -500 e do vetor pGL3 Basic.	<b>44</b>



<b>FIGURA 13:</b> Confirmação da clonagem do fragmento - 500.	<b>45</b>
<b>FIGURA 14:</b> Resultado do alinhamento da sequência obtida por seqüenciamento utilizando o oligonucleotídeo GL2 (Query) com o provável promotor do gene PHEX (fragmento de 1046 bp - Sbjct).	<b>46</b>
<b>FIGURA 15:</b> Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control, pRL-TK e pelo clone -500 em células de Schwann ST88-14.	<b>48</b>
<b>FIGURA 16:</b> Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control, pRL-TK e pelo clone -500 em cultura primária de osteoblastos.	<b>48</b>
<b>FIGURA 17:</b> Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control e pRL-TK cotransfectados em células de Schwann ST88-14 e relação vaga-lume /Renilla (Ratio).	<b>49</b>
<b>FIGURA 18:</b> Tentativa de clonagem do fragmento 1046.	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
<b>TABELA 1:</b> Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.	<b>21</b>
<b>TABELA 2:</b> Sequências dos oligonucleotídeos contendo sítios de restrição.	<b>22</b>
<b>TABELA 3:</b> Famílias de fatores de transcrição que apresentaram sítios de ligação no provável promotor, de acordo com o programa Eldorado.	<b>36</b>
<b>TABELA 4:</b> Identidade entre a região de 1046 bp do gene PHEX humano (hs2984), a sequência do gene PHEX de rato (rn20637) e o promotor de PHEX murino (mm90141) obtida com o programa DiAlign.	<b>39</b>
<b>TABELA 5:</b> Prováveis sítios de ligação de fatores de transcrição na sequência de 1046 bp, de acordo com o programa ModelInspector.	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	– adenina
ADHR	– raquitismo hipofosfatémico autossômico dominante
ASARM	– peptídeo protease resistente ASARM
BMPs	– proteínas morfogênicas do osso
bp	– pares de bases
C	– citosina
cDNA	– ácido desoxirribonucléico complementar
CLS	– Síndrome de Coffin-Lowry
dATP	– desoxiadenosina trifosfato
dCTP	– desoxicitidina trifosfato
DEMEM	– do inglês “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
dGTP	– desoxiguanosina trifosfato
DMP-1	– proteína de matriz dentina-1
DMSO	– dimetil sulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
dNTPs	– desoxirribonucleotídeos trifosfato
D.O.	– densidade ótica
dPHEX	– homólogo do gene PHEX isolado de <i>Drosophila melanogaster</i>
dTTP	– desoxitimidina trifosfato
ECE-1	– enzima convertidora de endotelina 1
ECE-2	– enzima convertidora de endotelina 2
EDTA	– ácido etilenodiaminotetracético
ErK1/2	– quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
FGF-23	– fator de crescimento de fibroblasto
FIOCRUZ	– Fundação Oswaldo Cruz
G	– guanina
GH	– hormônio de crescimento
HEPES	– N-2-Hidroxiethylpiperazina-N’-2-ácido etanosulfônico
HLA	– antígenos leucocitários humanos
HLP	– proteína semelhante à histona
IGF	– fator de crescimento semelhante à insulina
kb	– kilobase
kDa	– kilodalton

kV	– kilovolts
LB	– meio Luria-Bertani
Lck	– quinase de células linfóides
M	– molar
MEPE	– fosfoglicoproteína de matriz extracelular
mM	– milimolar
mRNA	– ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	– do inglês “National Center for Biotechnology Information”
NEP	– neprilisina
NF- $\kappa$ B	– fator nuclear kappa-B
°C	– graus Celsius
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PACRG	– gene co-regulado com PARK2
PAP110	– proteína ativadora de PHEX 110
PARK2	– gene associado à doença de Parkinson
PBS	– tampão salina fosfato
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-1	– glicolípido fenólico-1 específico de <i>M. leprae</i>
PHEX	– gene codificador da proteína PHEX (“Phosphate-regulating gene with homologie to endopeptidase on X chromossome”)
PKC $\epsilon$	– proteína quinase C epsilon
PQT	– poliquimioterapia
PTH	– hormônio paratireoideano
PTHrP	– peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideano
rpm	– rotações por minuto
RSK2	– quinase ribossomal S6
RT-PCR	– Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	– dodecil-sulfato de sódio
SMAR	– região de ancoramento às proteínas de matriz nuclear
T	– timina
TAE	– tampão tris-acetato EDTA
<i>Taq</i>	– <i>Thermus aquaticus</i>
TE	– tampão tris EDTA
TIO	– osteomalácias derivadas de tumor
TNF- $\alpha$	– fator de necrose tumoral $\alpha$

Tris	– trihidroximetil aminometano
tRNA	– ácido ribonucléico transportador
U	– unidade
UTR	– região não traduzida
UV	– ultravioleta
V	– volts
xg	– velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
XLH	– osteomalácia hipofosfatémica ligada ao cromossomo X
Xp22	– braço curto do cromossomo X, região 22
$\mu\text{M}$	– micromolar

# SUMÁRIO

	<i>Página</i>
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1. HANSENÍASE	1
1.1. Situação Global da Hanseníase	3
1.2. Patologia da Hanseníase	4
1.2.1. O dano neural	4
1.2.2. Lesões ósseas	5
2. A BIOLOGIA DO <i>Mycobacterium leprae</i>	6
3. ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDAS PELO <i>M. leprae</i>	7
4. PHEX (“Phosphate-regulating gene with Homologie to Endopeptidase on X chromossome”)	9
4.1. Doenças Associadas a PHEX	12
4.1.1. Osteomalácia hipofosfatémica ligada ao cromossomo X (XLH)	12
4.1.1.2. Síndrome de Coffin-Lowry	13
4.2. Papel Fisiológico de PHEX	13
4.3. Regulação da expressão do gene PHEX	16
II. OBJETIVOS	18
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
1. ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA	19
2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE CULTURAS DE CÉLULAS	19
3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	20
4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	23
5. DIGESTÃO DOS INSERTOS E DO VETOR	23
6. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CLONAGEM DO GEL DE AGAROSE	23
7. GERAÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES	24
8. PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES	24
9. TRANSFORMAÇÃO DE CEPAS DE <i>E. COLI</i>	25
10. MÉTODO DE SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES	25

11. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINI- PREP)	25
12. DIGESTÃO PARA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS VETORES	26
13. SEQUENCIAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES	26
14. VETORES EMPREGADOS	27
15. MANUTENÇÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN DA LINHAGEM ST88- 14 E DA CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOLASTOS	29
16. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	30
17. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE	31
IV. RESULTADOS	32
1. ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA	32
2. AMPLIFICAÇÃO DE DIFERENTES FRAGMENTOS DA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX	41
3. DIGESTÃO PARA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS VETORES	42
4. DIGESTÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS 1046 E -500 E DO VETOR PGL3 BASIC.	43
5. CLONAGEM DO FRAGMENTO -500	44
6. SEQUENCIAMENTO DO CLONE - 500	45
7. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE	47
8. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO 1046	50
V. DISCUSSÃO	51
VI. PERSPECTIVAS	59
VII. CONCLUSÃO	50
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Apesar do número de casos registrados de hanseníase no mundo ter reduzido desde 1985, o Brasil é atualmente o quinto país em prevalência de hanseníase no mundo, apresentando uma incidência de mais de 49 mil novos casos a cada ano. Os danos aos nervos periféricos constituem a principal consequência da infecção pelo *M. leprae*, resultando na perda da capacidade sensorial e motora dos mesmos. Entretanto, outro aspecto patológico importante da hanseníase são as alterações na estrutura óssea que contribuem para agravar as deformidades físicas características da doença. Estudos recentes sobre a interação entre o *M. leprae* e as células humanas revelaram que o *M. leprae* regula negativamente a expressão do gene PHEX, uma endopeptidase de membrana plasmática relacionada ao metabolismo de fosfato e que participa do processo de mineralização da matriz óssea. Essa modulação da expressão do gene PHEX pelo *M. leprae* aponta a proteína PHEX como um possível agente molecular nas osteopatias hansenianas. Os mecanismos utilizados pelo *M. leprae* para a inibição da expressão de PHEX ainda não são conhecidos e para a determinação dos mesmos é importante se estudar a regulação da expressão do gene PHEX. Estes estudos tornam-se complicados, pois a região promotora do gene PHEX humano ainda não foi caracterizada experimentalmente. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a região promotora do gene PHEX humano. Através da análise por bioinformática de uma seqüência de 4498 bp localizada à frente do início da fase de leitura aberta do gene PHEX humano identificou-se uma região de 1046 nucleotídeos com grandes possibilidades de corresponder à região promotora deste gene. Esta região bem como um fragmento contendo metade da provável região promotora (546 bp) foram obtidas através de PCR utilizando iniciadores específicos. Posteriormente, partiu-se para a clonagem destes fragmentos para que a potencial função reguladora destas regiões fosse analisada por ensaios de “gene reporter” (luciferase). Assim, o fragmento de 546 bp foi clonado no vetor pGL3-Basic (clone -500) e a clonagem do fragmento de 1046 bp está em andamento. Tanto em osteoblastos quanto em células de Schwann o clone -500 não foi capaz de gerar luminosidade, mostrando que a porção de 546 bp do provável promotor não é suficiente para a indução da expressão do gene PHEX humano. A comparação deste resultado com os obtidos com o promotor murino, aonde foi possível identificar a expressão da luciferase mesmo em constructos muito menores do que o nosso clone -500, sugere que a porção mínima necessária para a indução da expressão de PHEX *in vivo* varia consideravelmente entre seres humanos e camundongos.



## ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Although the global number of leprosy registered cases has decreased since 1985, Brazil is still the fifth country in prevalence of the disease in the world, presenting an incidence of more than 49.000 new cases per year. Peripheral nerve damage is the most important consequence of leprosy leading to sensitiveness and motor loss of the infected nerves. Another important pathological aspect is the frequent incidence of bone alterations that contribute to the physical deformities that are hallmarks of the disease. Recent studies focused on the interaction of *M. leprae* with human cells have shown that *M. leprae* is able to down regulate the expression of PHEX. This gene codes for a membrane endopeptidase related to the phosphate metabolism, which is involved in the mineralization of the bone extracellular matrix. The modulation of PHEX gene expression by the *M. leprae* points PHEX as a possible molecular agent of the bone alterations seen in leprosy. In order to define the mechanisms used by *M. leprae* to inhibit PHEX expression, studies on the regulation of PHEX gene expression are required. These studies have been hampered by the fact that the promoter region of the human PHEX gene has not been experimentally characterized. The aim of the present work was to identify and characterize the promoter region of the human PHEX gene. By using bioinformatic tools, the analysis of a sequence of 4498 bp located in front of PHEX open reading frame allowed the identification of a region of 1046 nucleotides that probably corresponds to the promoter of this gene. This region as well as a smaller region containing half of the putative promoter (546 bp) were amplified by PCR using specific primers. The fragment of 546 bp was successfully cloned in the pGL3-Basic vector (-500 clone) and the cloning of the fragment of 1046 bp is in progress. The potential regulating function of the region of 546 bp was analyzed using luciferase gene reporter assays. The -500 clone was not able to generate luminosity in osteoblasts and Schwann cells, indicating that the portion of 546 bp of the putative promoter is not sufficient for the induction of human PHEX gene expression. A comparison of our results with those obtained with the murine promoter, in which luciferase expression was achieved with fragments shorter than 546 bp, suggests that the minimum region necessary for the induction of PHEX expression in vivo varies considerably in human and mouse.

# I. INTRODUÇÃO

## **1. HANSENÍASE**

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Este patógeno foi o primeiro microorganismo a ser reconhecido como agente causador de uma enfermidade humana, em 1873 por Gerhard Armauer Hansen. Entretanto, mesmo atualmente, pouco se sabe sobre a biologia deste microorganismo e os mecanismos de interação deste com as células hospedeiras.

O *M. leprae* infecta principalmente a pele, as células do sistema de fagócitos mononucleares e as células de Schwann do sistema nervoso periférico e tem preferência por crescer em regiões mais frias do corpo (Britton e Lockwood, 2004). Entretanto, sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença. Nesses casos os linfonodos, olhos, mucosas aéreas superiores, testículos, fígado e medula óssea podem abrigar grande quantidade do bacilo (Araújo, 2003; Britton e Lockwood, 2004).

As mucosas das vias respiratórias representam, provavelmente, o principal sítio de entrada e eliminação dos bacilos, mas a pele erodida pode, eventualmente, ser porta de entrada da infecção (Araújo, 2003). O período de incubação entre a infecção e o desenvolvimento da doença é muito longo, podendo variar de 2 a 20 anos (Lockwood e Suneetha, 2005).

Acredita-se que mais de 90% da população desenvolva uma imunidade adequada contra o *M. leprae* e não desenvolva sintomas clínicos detectáveis. Entre os indivíduos susceptíveis a doença manifesta-se sob uma grande variedade de formas clínicas que serão determinadas em função da resposta imune do paciente. De acordo com o sistema de classificação proposto por Ridley e Jopling (1966), a hanseníase pode ser dividida em cinco grupos que leva em consideração a disseminação da doença e o nível de imunidade celular. Em um dos extremos do espectro encontramos os pacientes lepromatosos polares, que possuem uma alta resposta da imunidade humoral e uma baixa resposta da imunidade celular. Estes pacientes normalmente apresentam-se com elevada carga bacilar e numerosas lesões cutâneas. Do outro lado temos os pacientes conhecidos como tuberculóides polares. Estes possuem uma forte resposta imune celular adquirida, uma reduzida carga bacilar e raras lesões cutâneas. Vários pacientes apresentam características que os colocam em posições intermediárias entre estes pólos, sendo então classificados como: "borderline" lepromatoso, "mid-borderline", e "borderline" tuberculóide (Spierings *et al.*, 2000).

Para facilitar a identificação dos pacientes, principalmente em países endêmicos subdesenvolvidos, a OMS (Organização Mundial de Saúde) propõe a utilização de uma classificação clínica da hanseníase. Essa metodologia utiliza o número de lesões de pele

para agrupar os pacientes em paucibacilares (até cinco lesões) ou multibacilares (mais de cinco lesões) (Lockwood e Kumar, 2004).

Segundo a recomendação da OMS, o tratamento da hanseníase é feito através da poliquimioterapia (PQT– Rifampicina, Dapsona e Clofazimina), e tem a duração de seis meses para os pacientes paucibacilares e 12 meses para os pacientes multibacilares (Lockwood e Kumar, 2004). O Ministério da Saúde define como caso de hanseníase para tratamento quando um ou mais dos seguintes achados encontram-se presentes: lesão de pele com alteração de sensibilidade, espessamento de tronco nervoso ou baciloscopia positiva da pele.

Algumas características epidemiológicas, como a distribuição da doença em famílias ou comunidades com antecedentes genéticos comuns, sugerem que fatores genéticos possam ser associados à vulnerabilidade ou a evolução clínica da hanseníase (Araújo, 2003). Entre as regiões do genoma candidatas estão os genes da interleucina-10 (Morales *et al.*, 2004), do TNF $\alpha$  (Santos *et al.*, 2002), dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (Van Eden *et al.*, 1980) e os genes PARK2 (gene associado à doença de Parkinson) e PACRG (Mira *et al.*, 2004). Entretanto, a hanseníase deve ser entendida como uma doença complexa, sendo também influenciada por fatores ambientais (Gallo, 2005).

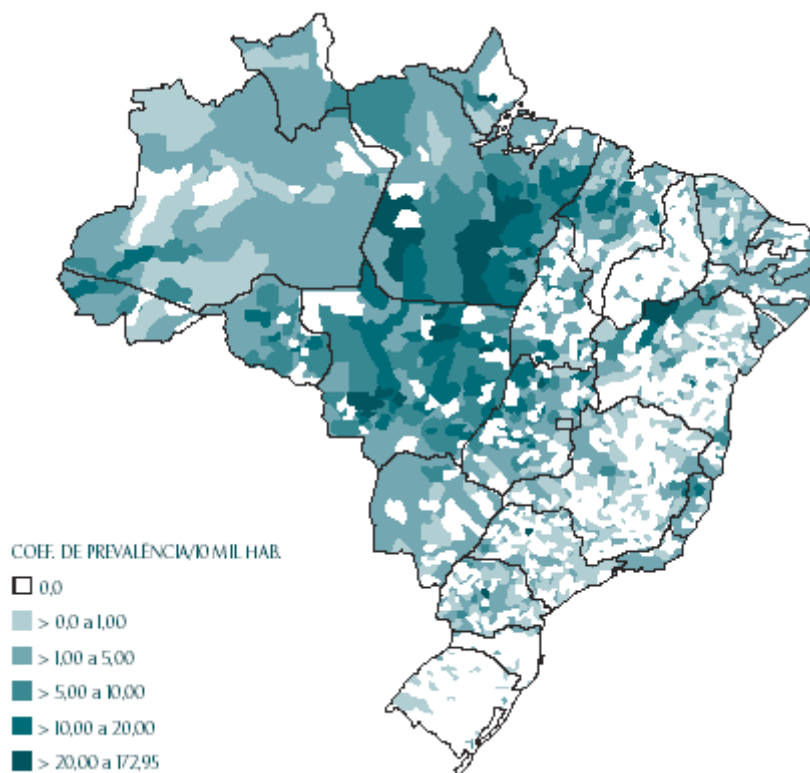
Os pacientes hansenianos também podem apresentar episódios reacionais que representam quadros inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase (Araújo, 2003). Os tipos de reação mais importantes são a reação reversa ou do tipo 1 e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso. A reação reversa é causada por um aumento da reatividade dos linfócitos T aos antígenos micobacterianos e resulta em dor e edema das lesões de pele e dos nervos periféricos. O eritema nodoso é uma resposta inflamatória sistêmica causada pela deposição extravascular de imunocomplexos que pode afetar vários órgãos (Britton e Lockwood, 2004). Segundo estudos do ambulatório de hanseníase da FIOCRUZ dentre os pacientes multibacilares 45% desenvolvem reação reversa e 55% apresentam o eritema nodoso (Nery *et al.*, 1998). Os quadros reacionais, às vezes, antecedem o diagnóstico da hanseníase, surgem durante ou após o tratamento. Estes episódios devem ser prontamente diagnosticados e tratados com anti-inflamatórios e analgésicos (Araújo, 2003).

## **1.1. Situação Global da Hanseníase**

O Projeto de Eliminação da Hanseníase da Organização Mundial de Saúde tem como objetivo reduzir a prevalência da doença em 1 caso para cada 10.000 habitantes. A estratégia deste projeto se baseia em promover o acesso ao diagnóstico e o tratamento dos doentes com a PQT. Essa estratégia tem sido eficaz. Desde o início da utilização da PQT, em 1985, a prevalência (número de casos por 10.000 habitantes) global foi reduzida em quase 90%, e mais de 13 milhões de pacientes foram curados (WHO, 2004).

Mais recentemente, o número de novos casos detectados no mundo foi reduzido em 21% durante 2004, comparado com 2003. Esse declínio deve-se principalmente a redução do número de novos casos detectados na Índia, 29% em relação a 2003. Entretanto, a hanseníase permanece como um problema de saúde pública em 9 países: Angola, Brasil, República Central Africana, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e União Republicana da Tanzânia (WHO, 2005).

O Brasil apresentou uma significativa redução da prevalência da doença de 4,6 no início de 2004, para 1,7 no início de 2005, devido a uma atualização do registro de pacientes. Assim, o Brasil é, atualmente, o quinto país em prevalência de hanseníase no mundo, apresentando uma incidência de mais de 49 mil novos casos a cada ano (WHO, 2005). As áreas de maior risco do país são os estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Presidência da república, 2004), como pode ser visto na **FIGURA 1**.



**FIGURA 1: Taxas de prevalência da hanseníase no Brasil em dezembro de 2004** (Presidência da república, 2005).

## 1.2. Patologia da Hanseníase

### 1.2.1. O dano neural

Apesar da PQT ser um tratamento eficaz contra a infecção, ainda existem no mundo cerca de 2 a 3 milhões de pessoas com deformidades decorrentes da infecção pelo *M. leprae* (WHO, 2004). Isto ocorre, pois o tratamento, principalmente quando iniciado tardiamente, não impede os danos aos nervos periféricos que são os responsáveis pela perda permanente da capacidade sensorial e motora dos nervos atacados.

A lesão neural é um resultado de dois processos. Primeiramente, a presença do bacilo induz a desmielinização dos axônios através de um mecanismo contato dependente. As células de Schwann mielinizadas não são infectadas pelo *M. leprae*, assim, acredita-se que o patógeno induza a desmielinização e conseqüentemente o dano neural, o que, leva a proliferação de células de Schwann não mielinizadas, aumentando assim o número de células vulneráveis a infecção (Rambukkana *et al.*, 2002).

A segunda causa do dano neural é resultado da resposta imune a presença de antígenos derivados do *M. leprae* no nervo. Esta resposta lesa os nervos através da invasão dos mesmos pelas células imunes e pela compressão das células de Schwann pelo edema inflamatório (Pearson e Ross, 1975). Neste processo as células de Schwann podem ter um papel fundamental, por apresentar os antígenos do *M. leprae* as células T citotóxicas. Assim, o comprometimento nervoso ocorre em todas as formas da doença, mas é sem dúvida agravado pelos episódios reacionais (Spierings *et al.*, 2000).

A lesão neural pode ocorrer antes do diagnóstico, durante ou após o tratamento com a PQT. Detectar e tratar o dano neural o mais cedo possível é essencial para prevenir as deformidades das mãos, pés, faces e olhos que tanto estigmatizam esta doença (Lockwood e Kumar, 2005).

### **1.2.2. Lesões ósseas**

Um aspecto muito importante da hanseníase é que os pacientes apresentam alterações na estrutura óssea que contribuem para agravar as deformidades características da doença. Apesar de exames radiológicos não representarem uma rotina no diagnóstico e tratamento da hanseníase, o que dificulta uma estimativa da frequência destas alterações, estudos clínicos mostram que as lesões ósseas estão presentes em 82,9 a 91% dos pacientes (Choudhuri *et al.*, 1999).

As alterações ósseas podem ser subdivididas em específicas, não específicas e osteoporose. As alterações específicas são induzidas, diretamente, pela presença do *M. leprae*. As alterações inespecíficas são geradas de forma indireta, em consequência das lesões nervosas, de alterações vasculares ou pelo somatório de outros fatores como traumas e infecções secundárias. A osteoporose, por sua vez, é resultante da elevada carga bacilar, da inflamação local e da imobilização ou atrofia dos membros (Dave *et al.*, 2004). Entretanto, é importante ressaltar que muitas lesões ósseas são o resultado do somatório de múltiplos fatores, alguns deles difíceis de serem verificados (Choudhuri *et al.*, 1999).

A frequência das lesões ósseas apresenta uma correlação significativa com a duração da doença, o grau de incapacidade e a falta ou o não término do tratamento (Choudhuri *et al.*, 1999). Entretanto, o dano ósseo pode evoluir mesmo após o paciente ter sido considerado bacteriologicamente curado. Por isso o acompanhamento médico é importante mesmo após a cura (Carpintero *et al.*, 1998).

Os pacientes com hanseníase também apresentam uma maior tendência de perder dentes e uma saúde periodontal deteriorada em todas as formas da doença, o que pode estar relacionado com alterações ósseas na região periodontal (Núñez-Martí *et al.*, 2004).

Em última análise, as alterações ósseas são resultantes da reabsorção óssea, sendo assim, seria esperado que os pacientes hansenianos apresentassem um nível elevado ou normal de cálcio plasmático. Entretanto, estudos mostram que existe uma elevada frequência de hipocalcemia em paciente hansenianos principalmente naqueles com a forma lepromatosa da doença. Vidal e colaboradores (1993) demonstraram que a hipocalcemia no grupo estudado não estava relacionada à carência alimentar, problemas de absorção intestinal ou ao metabolismo da vitamina D<sub>3</sub>. Apesar da diminuição da concentração do cálcio total, a concentração de cálcio ionizado no soro dos pacientes estudados estava normal. Por isso, Vidal e colaboradores (1993) sugeriram que a hipocalcemia é um resultado de uma alteração na habilidade das proteínas plasmáticas de se ligarem ao cálcio. Alguns ensaios realizados por eles demonstraram que as proteínas do plasma dos pacientes realmente ligam-se a uma porção menor de cálcio do que as proteínas plasmáticas do grupo controle. Entretanto esses dados ainda não são totalmente conclusivos.

Mautalen e colaboradores (1994) não conseguiram confirmar a elevada frequência de hipocalcemia em paciente hansenianos. Dos 47 pacientes estudados por eles apenas oito apresentavam uma hipocalcemia moderada. Com isso, Mautalen e colaboradores (1994) sugerem que a homeostase de cálcio é normal na maioria dos pacientes com hanseníase e apenas excepcionalmente é possível se detectar alterações significantes.

Outros estudos compararam os níveis séricos de vários íons de pacientes hansenianos com os de pessoas saudáveis, demonstrando que não só os níveis de cálcio são significativamente menores nos pacientes, como também os níveis de zinco e sódio (Mennen *et al.*, 1993) e magnésio (Sinha *et al.*, 1978; Nigam *et al.*, 1979).

A despeito dos vários estudos, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na regulação do metabolismo de cálcio e outros íons e como isso afeta a incidência e gravidade das lesões ósseas em hansenianos ainda permanecem pouco compreendidos.

## **2. A BIOLOGIA DO *Mycobacterium leprae***

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta, principalmente, o endotélio vascular, fagócitos mononucleares e apresenta especial afinidade pelas células de Schwann, sendo o único patógeno capaz de invadir e sobreviver nesta célula (Gallo, 2005). Esta capacidade de invadir a célula de Schwann se deve a ligação do componente de parede PGL-1 (glicolípido fenólico-1 específico de *M. leprae*) ao domínio G da cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2, o componente mais abundante da lamina basal que envolve a unidade célula de Schwann-axônio (Ng *et al.*, 2000). A  $\alpha$ -distoglicana presente nas membranas das células de Schwann, por sua vez, funciona como receptor para o *M. leprae* apenas na presença do domínio G da cadeia  $\alpha 2$  da laminina (Rambukkana *et al.*, 1998). Outra proteína de *M. leprae* crucial para ligação a laminina- $\alpha 2$  é a HLP (proteína semelhante à histona) que funciona como uma adesina de superfície. Embora estas interações tenham um papel fundamental na ligação e provavelmente invasão do *M. leprae* na célula de Schwann, outros receptores e ligantes provavelmente estão envolvidos neste processo (Marques *et al.*, 2000).

O *M. leprae* multiplica-se de forma muito lenta, apresentando o maior tempo de geração de todas as bactérias conhecidas (~14 dias) e, até o presente momento, todas as tentativas de induzir seu crescimento *in vitro* não obtiveram resultados satisfatórios. Assim, as únicas fontes de *M. leprae* para pesquisa são o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*), um hospedeiro natural (Kirchheimer e Storrs, 1971) e camundongos infectados na pata (Shepard, 1960). Esta incapacidade de crescimento *in vitro*, bem como a baixa taxa de duplicação do bacilo, talvez, possam ser explicadas pela redução do genoma do *M. leprae*

(3,27 megabases – Mb) quando comparado ao do *M. tuberculosis* (4,41 Mb). Além disso, apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* contem genes codificantes para proteínas e 27% é composto por pseudogenes. Isto representa a maior degradação de um genoma (chamado evolução redutiva) já identificada em um microorganismo intracelular obrigatório (Cole *et al.*, 2001).

Como as demais micobactérias, o *M. leprae* possui um envoltório de composição peculiar, rico em lipídeos complexos e distintos dos que são normalmente encontrados em outros grupos de bactérias. Esse envelope possui baixa permeabilidade gerando a resistência do patógeno contra uma série de agentes terapêuticos normalmente utilizados contra outras bactérias. Além disso, muitas das propriedades responsáveis pela infectividade do bacilo são decorrentes das características estruturais peculiares do seu envoltório, como foi visto anteriormente (Brennan e Nikaido, 1995).

### **3. ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDAS PELO *M. LEPRAE***

As ferramentas genéticas são amplamente utilizadas para a identificação de genes e, conseqüentemente, dos processos imunológicos envolvidos na resposta das células do sistema imune ao *M. leprae* (Alcais *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre as alterações na expressão gênica induzidas pelo *M. leprae* nas células de Schwann.

Neste sentido, Tapinos e Rambukkana (2005) demonstraram que o *M. leprae*, após um longo período de infecção (30 dias) induz a transcrição do gene da ciclina D1, com comprovada elevação na quantidade desta proteína. O aumento da transcrição de ciclina D1 é gerado pela ativação de ErK1/2 e leva a um aumento da proliferação celular. Esta proliferação em condições normais é ativada por fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular. Entretanto, o *M. leprae* não utiliza a via de ativação de ErK1/2 previamente conhecida que envolve as proteínas Ras/Raf/MEK. Intracelularmente o *M. leprae* induz a ativação de PKC $\epsilon$  que fosforila Lck (quinase de células linfóides) que por sua vez é responsável pela ativação de ErK1/2. Assim o *M. leprae* induz a proliferação das células de Schwann para garantir a colonização e sobrevivência bacteriana por um longo período.

Outro estudo demonstrou que o *M. leprae* induz a translocação para o núcleo de dois dímeros do fator de transcrição NF-kB, p65/p50 e p50/p50 na linhagem de células de Schwann ST88-14. Essa translocação leva a repressão da transcrição dependente de NF-kB, o que provavelmente é gerado pelo complexo inibidor da transcrição p50/p50. A ativação desse homodímero de NF-kB pôde ser inibida pela talidomida, que é uma droga utilizada em alguns casos de episódios reacionais na hanseníase. Esse estudo é um exemplo de como os processos



de sinalização das células de Schwann podem ser modulados pelo *M. leprae* (Pereira *et al.*, 2005).

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar as alterações na expressão gênica da célula de Schwann ST88-14 induzidas pela interação com o *M. leprae*. Estas pesquisas já verificaram a indução da expressão de mRNA para IGF-I após 4 horas de incubação das células ST88-14 com *M. leprae* e de mRNA para IGF-II após 24 horas de incubação com a micobactéria. Esses dados, juntamente com o já conhecido papel neuroprotetor de IGF-I e IGF-II sugerem que a indução pelo *M. leprae* desses hormônios é uma provável estratégia para inibir vias apoptóticas na célula de Schwann de forma a garantir a sua sobrevivência (Rodrigues, 2005).

Posteriormente, em nosso laboratório, foi utilizada a técnica de Differential display-RT-PCR, aonde o mRNA, total ou poli A<sup>+</sup>, de células de Schwann incubadas ou não com *M. leprae* foi extraído, convertido a cDNA e amplificado por PCR utilizando combinações de oligonucleotídeos aleatórios. A comparação do perfil de bandas gerado em cada amostra após fracionamento eletroforético em gel de seqüenciamento de DNA permite a identificação de genes ou grupos de genes cuja expressão esteja sendo ativada ou reprimida em função da presença do patógeno. Oligonucleotídeos específicos para os genes identificados são desenhados e utilizados em reações de RT-PCR semiquantitativo. Essa reação, cujo objetivo é confirmar a expressão diferencial do gene candidato, tem como molde os cDNAs oriundos da incubação de novas culturas de células com o patógeno.

Através dessa técnica, descobriu-se que o gene PHEX (do inglês “Phosphate-regulating gene with Homologie to Endopeptidase on X chromossome”) é reprimido com a presença do *M. leprae*. O que foi confirmado por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tempone *et al.*, dados não publicados).

O gene PHEX está descrito na literatura como sendo uma endopeptidase de membrana plasmática que participa dos processos de regulação da homeostase de fosfato. A expressão deste gene ocorre predominantemente nos ossos (Du *et al.*, 1996; Beck, *et al.*, 1997; Lipman *et al.*, 1998) e dentes (Ruchon *et al.*, 1998), mas também pode ser verificada em outros tecidos (Beck *et al.*, 1997).

Assim como nas células de Schwann, a repressão da expressão de PHEX também pôde ser verificada em culturas primárias de osteoblastos humanos incubados com *M. leprae*. Além disso, experimentos de avaliação citométrica conduzidos por nosso grupo, detectaram a presença da peptidase PHEX na superfície das células de Schwann ST-8814, osteoblastos e em elementos da série branca sangüínea humana.

Posteriormente, a expressão de PHEX em elementos da série branca sangüínea

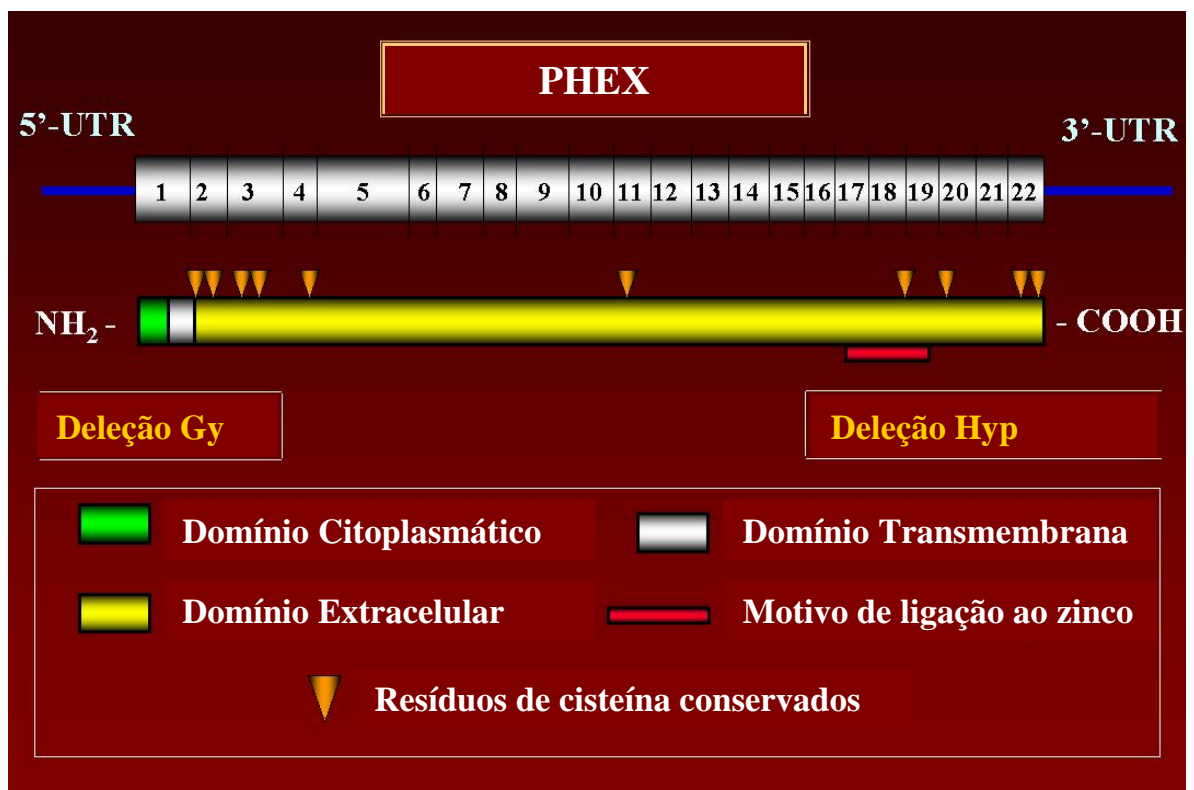
humana de 5 pacientes com hanseníase lepromatosa, antes do início da PQT foi comparada com a de 5 voluntários sadios, através da técnica de citometria de fluxo. Quatro pacientes apresentaram uma diminuição na expressão de PHEX em comparação com o grupo controle. O paciente que não apresentou esta redução apresentava menos alterações ósseas e o menor índice baciloscópico, em comparação com os demais pacientes (Tempone *et al.*, dados não publicados).

Estes resultados sugerem que níveis alterados de expressão do gene PHEX podem estar relacionados com a patogenicidade do *M. leprae*.

#### **4. PHEX (“Phosphate-regulating gene with Homologie to Endopeptidase on X chromossome”)**

O gene PHEX está localizado no cromossomo X (Xp22), sendo composto por 22 éxons separados por grandes íntrons, totalizando uma seqüência de 220 kilobases (Francis *et al.*, 1997), que gera um transcrito primário de 6,5 kb, identificado por experimentos de Northern blot (Lipman *et al.*, 1998). Anotações atualizadas sobre o gene PHEX referem-se a um mRNA maduro de cerca de 3310 bp (“Unigene – NCBI” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/seq.cgi?ORG=Hs&SID=3219393>). O cDNA deste gene codifica uma proteína de 749 aminoácidos que apresenta homologia estrutural com membros da família de endopeptidases M13 (Lipman *et al.*, 1998).

A família M13 é composta por metaloendopeptidases que contêm um conservado motivo de ligação ao zinco. Estas enzimas são glicoproteínas integrais de membrana que possuem um curto domínio citoplasmático N-terminal, um único domínio transmembrana e uma longa porção extracelular que contém o sítio ativo da enzima. Além disso, os membros desta família possuem dez resíduos de cisteína conservados no domínio extracelular que formam pontes dissulfeto importantes para a manutenção da estrutura e atividade das enzimas. Membros desta família são a neprilisina (NEP) que metaboliza peptídeos regulatórios do sistema nervoso, imune e cardiovascular, as enzimas conversoras de endotelina (ECE-1 e ECE-2) que participam do processo de ativação do potente vasoconstrictor endotelina, e KELL que é o maior antígeno humano de eritrócitos. A incompatibilidade à KELL pode causar hemólise severa em transfusões de sangue, entretanto seu papel fisiológico ainda não é conhecido. O importante papel das enzimas da família M13 no processamento ou metabolismo de peptídeos regulatórios sugere que elas representam alvos terapêuticos em potencial (Turner e Tanzawa, 1997; Turner *et al.*, 2001). Na **FIGURA 2** encontra-se a estrutura do gene e da proteína PHEX como um exemplo da estrutura apresentada pela família



**FIGURA 2: Estrutura do gene e da proteína PHEX** (Adaptado de Tenenhouse, 1999).

A expressão de PHEX ocorre predominantemente nos osteoblastos (Du *et al.*, 1996; Beck, *et al.*, 1997; Lipman *et al.*, 1998), mas também é muito importante nos odontoblastos (Ruchon *et al.*, 1998), e nos condrócitos em divisão e hipertróficos (Miao *et al.*, 1998). A expressão de PHEX varia de acordo com a idade, sendo menor nos ossos e dentes do adulto do que durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, a expressão de PHEX em osteoblastos de embriões só é detectável a partir do início da mineralização da matriz, ou seja, em osteoblastos diferenciados (Ruchon *et al.*, 1998).

A análise de tecidos humanos também demonstrou a expressão de PHEX em linfócitos, células do ovário e pulmão de adultos. Durante o desenvolvimento embrionário PHEX também é expresso no pulmão, fígado (Grieff *et al.*, 1997 Feb), ovário e músculo esquelético (Beck, *et al.*, 1997). Além disso, estudos em camundongos adultos ainda revelaram a expressão de PHEX no cérebro, testículos e músculo (Beck, *et al.*, 1997). Apesar de sua função na regulação da reabsorção de fósforo a nível renal, a proteína PHEX não é expressa nos rins (Beck, *et al.*, 1997; Zoidis, *et al.*, 2000).

#### **4.1. Doenças Associadas a PHEX**

##### **4.1.1. Osteomalácia hipofosfatêmica ligada ao cromossomo X (XLH)**

O gene PHEX foi identificado através da tentativa de se determinar o gene responsável pela osteomalácia hipofosfatêmica ligada ao cromossomo X (XLH), utilizando-se para isto a técnica de clonagem posicional (HYP Consortium, 1995). Atualmente, 188 mutações do gene PHEX já foram identificadas, a maioria em pacientes com XLH (Sabbagh e Tenenhouse, 2006). O XLH é a causa mais freqüente de raquitismo hereditário em humanos e afeta cerca de um indivíduo a cada 20 mil nascimentos. As principais conseqüências desta doença de caráter dominante são: baixa estatura, hipofosfatemia e defeitos na mineralização óssea, na reabsorção de fosfato pelos rins e no metabolismo da vitamina D. Os pacientes ainda apresentam deformidades nos membros inferiores, dores nos ossos e abscessos dentários (Econs e Francis, 1997). Entretanto a severidade e o fenótipo da doença variam consideravelmente, mesmo entre indivíduos da mesma família e a única característica invariável é a hipofosfatemia (Econs, 1999).

Antes da descoberta do gene responsável pelo XLH dois camundongos com fenótipo semelhante ao observado na doença humana haviam sido identificados (*Hyp* e *Gy*). O camundongo *Hyp* foi gerado por uma mutação espontânea e apresenta essencialmente os mesmos sintomas dos pacientes XLH (Eicher *et al.*, 1976). O camundongo *Gy*, gerado por mutações induzidas por radiação, apresenta, em adição as variações apresentadas por *Hyp*, machos estéreis, com alterações comportamentais e reduzida viabilidade. Estudos posteriores demonstraram que as regiões 3' e 5' do gene PHEX estão deletadas nos camundongos *Hyp* e *Gy*, respectivamente (Strom *et al.*, 1997) (**FIGURA 2**). Entretanto, descobriu-se que a deleção nos camundongos *Gy* se estende, atingindo o gene da espermina sintase, o que justifica o fenótipo adicional apresentado pelos machos deste camundongo (Meyer *et al.*, 1997).

Após estas descobertas, embora os dois camundongos estejam sendo estudados, um número maior de experimentos tem sido feito com o camundongo *Hyp*, e estes experimentos são os responsáveis pela maior parte do entendimento atual sobre o XLH (Econs e Francis, 1997). Alguns desses estudos demonstraram uma redução de aproximadamente 50% tanto do mRNA quanto da proteína do cotransportador NaPi-2 nos camundongos *Hyp* quando comparados com camundongos normais (Teneshouse *et al.*, 1994). A expressão do cotransportador NaPi-2 ocorre nos túbulos proximais, sendo este transportador o principal responsável pela reabsorção de fosfato pelos rins (Teneshouse *et al.*, 1998). A redução na expressão de NaPi-2 poderia explicar a hipofosfatemia apresentada pelos camundongos *Hyp*, entretanto, como as mutações no gene PHEX levam a esta expressão reduzida ainda não foi compreendido.

#### **4.1.1.2. Síndrome de Coffin-Lowry**

A Síndrome de Coffin-Lowry (CLS) é uma doença hereditária rara ligada ao cromossomo X, na qual os homens afetados apresentam retardo mental severo, atraso no crescimento, alterações ósseas progressivas e traços anatômicos característicos, principalmente no rosto e nas mãos. Nas mulheres a sintomatologia é bastante variada, incluindo desde retardo severo até uma performance intelectual relativamente normal (Hanauer e Young, 2002).

O gene da RSK2 (quinase ribossomal S6) foi identificado em 1996 como o responsável pela CLS. Este gene contém 22 éxons que codificam uma proteína de 740 aminoácidos e nele já foram identificadas 75 mutações patogênicas (Hanauer e Young, 2002). A proteína RSK2 é um membro da família das serina-treonina quinases reguladas por fatores de transcrição, que estão envolvidas na estimulação da proliferação e diferenciação celular (Blair *et al.*, 1998).

Recentemente, David e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão de PHEX está reprimida em camundongos “knockout” para RSK2. Esses camundongos apresentavam defeitos na mineralização óssea, entretanto, menos severos do que os apresentados pelos camundongos *Hyp*. Essas diferenças na severidade se devem, provavelmente, ao fato dos camundongos “knockout” para RSK2 não apresentarem hipofosfatemia. Esses dados sugerem que a repressão da expressão do gene PHEX possa ser um dos responsáveis pelas anormalidades óssea progressivas apresentadas por paciente com CLS.

## **4.2. Papel Fisiológico de PHEX**

A perda da função de PHEX causa a falta de reabsorção de fosfato pelos rins e a não mineralização da matriz óssea, entretanto os mecanismos pelos quais PHEX desempenha suas atividades fisiológicas ainda são pouco conhecidos. A similaridade de PHEX com os membros da família M13 sugere que esta proteína atue pela ativação ou inativação de peptídeos bioativos (Boileu *et al.*, 2001). Neste sentido, estudos mostraram que a proteína PHEX é capaz de hidrolisar o hormônio paratireoideano (PTH) (Lipman *et al.*, 1998) e o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideano (PTHrP<sub>107-139</sub>). Entretanto, a importância fisiológica destas degradações ainda não foi compreendida, uma vez que o sítio de clivagem identificado no PTHrP<sub>107-139</sub> humano não é conservado em ratos e camundongos (Boileu *et al.*, 2001); e a homeostase de cálcio é geralmente preservada nos pacientes com XLH, o que não seria esperado se estes pacientes possuísssem uma deficiência na degradação de PTH (Lipman *et al.*, 1998).

A atividade de PHEX sobre o PTHrP<sub>107-139</sub> é inibida por fosfato e pirofosfato, que é um substrato da fosfatase alcalina abundante nos ossos e capaz de inibir a cristalização de hidroxiapatita *in vitro*. Outro inibidor é a osteocalcina, que é uma proteína de grande importância nos processos de remodelação óssea sendo expressa pelos osteoblastos (Boileu *et al.*, 2001).

Outra proteína demonstrada como sendo degradada por PHEX é o fator de crescimento de fibroblasto (FGF-23) (Bowe *et al.*, 2001). Este fator impede a reabsorção de fosfato nos túbulos renais, entretanto não se sabe se isso ocorre direta ou indiretamente. FGF-23 é produzido pelo tumor nos casos de osteomalácias derivadas de tumor (TIO) e acredita-se que o alto nível de FGF-23 circulante possa ser o responsável pela hipofosfatemia apresentada por estes pacientes. A retirada do tumor normaliza o metabolismo do fosfato (Shimada *et al.*, 2001). Três diferentes mutações no provável sítio de clivagem de FGF-23 são as responsáveis pelo raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante (ADHR) que causa baixa estatura, deformidades ósseas, hipofosfatemia e defeitos no metabolismo da vitamina D. Essas mutações provavelmente impedem a degradação e conseqüentemente a inativação de FGF-23 (Takeda *et al.*, 2004).

Entretanto, Liu e colaboradores (2003) não verificaram a degradação de FGF-23 por PHEX, mas demonstraram que as mutações do gene PHEX levam a um aumento da expressão do mRNA de FGF-23 no osso e em culturas de osteoblastos. Um aumento de FGF-23 circulante já havia sido demonstrado em pacientes com XLH (Yamazaki *et al.*, 2002). Liu e colaboradores (2003) propõem que a atuação de PHEX em um substrato desconhecido regule a expressão de FGF-23 para controlar a excreção de fosfato pelos rins.

Alguns estudos demonstraram que osteoblastos derivados de camundongos *Hyp* possuem um defeito intrínseco na mineralização, ou seja, independente da hipofosfatemia apresentada por estes animais. Esse fenótipo predomina em co-cultura de osteoblastos *Hyp* com osteoblastos normais (Xiao *et al.*, 1998). Outros estudos realizados com osteoblastos transfectados com vetores de expressão de PHEX-antisense, que resulta em um declínio na expressão de PHEX, também demonstraram que o meio condicionado destas células é capaz de inibir a incorporação de cálcio por osteoblastos normais e a absorção de fosfato no túbulo proximal *in vitro*. Estes dados sugerem que as alterações de PHEX levam a liberação de fatores específicos capazes de atuar em outras células (Shih *et al.*, 2002).

Esses defeitos intrínsecos da mineralização levaram a procura de moduladores da mineralização que fossem degradados por PHEX. Neste sentido, investigou-se a fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE). Entretanto, descobriu-se que MEPE não é um substrato de PHEX, mas que PHEX regula o metabolismo desta proteína de matriz extracelular, pela inibição de sua degradação enzimática. Especula-se, que o excesso de produtos de degradação de MEPE em sistemas com alterações de PHEX seja o responsável pela inibição da mineralização (Guo *et al.*, 2002). Estudos anteriores haviam demonstrado que o nível de mRNA de MEPE está elevado em osteoblastos derivados de camundongos *Hyp* (Argiro *et al.*, 2001). Essa superexpressão pode ser uma resposta compensatória da elevada degradação de MEPE (Guo *et al.*, 2002).

Por outro lado, o fato de MEPE ser produzido nas osteomalácias derivadas de tumor (TIO) (Shimada *et al.*, 2001) levou a investigação do papel desta proteína na hipofosfatemia apresentada pelos pacientes com TIO e XLH. A administração intraperitoneal de MEPE em camundongos levou a uma hipofosfatemia e hipofosfatúria dose-dependente (Rowe *et al.*, 2004). Entretanto, em um outro estudo a introdução de células secretando MEPE em camundongos não foi capaz de induzir hipofosfatemia (Shimada *et al.*, 2001).

Rowe e colaboradores (2005) confirmaram que PHEX liga-se especificamente a MEPE de forma dose e zinco dependente, inibindo a degradação de MEPE, como visto anteriormente. A região carboxi-terminal de MEPE que contém o motivo ASARM (peptídeo protease resistente ASARM) desempenha um papel importante nesta ligação. O peptídeo ASARM é um potente inibidor da mineralização, além de ser capaz de inibir a reabsorção de fosfato. Os autores sugerem que a ausência de PHEX funcional nos camundongos *Hyp* aumenta a degradação de MEPE e conseqüentemente a liberação do peptídeo ASARM, que seria o responsável pela hipofosfatemia e pelos defeitos na mineralização apresentados pelos camundongos *Hyp*. Esses dados estão em concordância com a transferência do fenótipo *Hyp* em culturas de osteoblastos e com a indução de hipofosfatemia pela administração de MEPE

em camundongos, conforme mencionado anteriormente. Outro fato interessante é que outra proteína que também é produzida nas osteomalácias derivadas de tumor (TIO), a DMP-1 (proteína de matriz dentina-1) (Shimada *et al.*, 2001), também possui o peptídeo ASARM na região carboxi-terminal, com alta homologia ao motivo de MEPE, sugerindo que MEPE e DMP-1 poderiam, conjuntamente, gerar o fenótipo de TIO (Rowe *et al.*, 2005).

Recentemente, três homólogos do gene PHEX foram isolados de *Drosophila melanogaster* (dPHEX-1, -2 e -3). Os três genes são expressos durante todos os estágios de desenvolvimento do inseto, sendo dPHEX-1 e -2 ubiquamente expressos. Mutações no gene dPHEX-1, em caráter homozigoto, é letal logo nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Ao contrário do que seria esperado, tendo em vista a provável função de PHEX em vertebrados, uma dieta com privação de fosfato foi capaz de suprimir a expressão de dPHEX-1. Estes resultados sugerem que o papel de PHEX em *Drosophila* difere do papel de PHEX em vertebrados. Por outro lado, também é possível especular que PHEX tenha um papel primordial diferente daqueles postulados até o momento, sendo este compartilhado por organismos em diferentes escalas da evolução (Ito *et al.*, 2004).

### 4.3. Regulação da expressão do gene PHEX

A maneira como a expressão de PHEX é controlada pode influenciar profundamente o seu papel fisiológico. Vários componentes já foram testados com relação a sua capacidade de regulação da expressão de PHEX. Com isso, verificou-se que a expressão de PHEX é estimulada durante a indução da mineralização por  $\beta$ -glicerosfosfato em culturas de osteoblasto (Ecarot e Desbarats, 1998) e que o tratamento de ratos com IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina), mas não com GH (hormônio de crescimento), causa um significativo aumento da expressão de PHEX no osso (Zoidis *et al.*, 2000).

O hormônio paratireoideano (PTH) e o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideano (PTHrP<sub>1-34</sub>), ambos envolvidos na regulação do metabolismo ósseo, inibem a expressão de PHEX em nível de mRNA e proteína. Essa inibição ocorre pela ligação destes fatores ao receptor PTH/ PTHrP com posterior ativação de PKA (proteína quinase A) (Vargas *et al.*, 2003). A concentração de PTH necessária para a inibição da expressão de PHEX *in vitro* é muito maior do que as concentrações de PTH circulante *in vivo*, sugerindo que *in vivo* PTH só é capaz de inibir a expressão de PHEX em condições de hiperparatireoidismo, o que foi confirmado pela indução desta condição em camundongos. Entretanto, PTHrP<sub>1-34</sub> produzido localmente por osteoblastos pode ser capaz de inibir a expressão de PHEX *in vivo* de forma parácrina ou autócrina (Alós e Ecarot, 2005).



Outra medida importante no sentido de se entender a regulação da expressão de PHEX é a caracterização de sua região promotora. Apesar da importância do gene PHEX na mineralização óssea e em importantes patologias, o promotor deste gene humano ainda não foi caracterizado experimentalmente. Os dados presentes na literatura, neste sentido, são o sequenciamento da região 5' não traduzida e toda a sequência anterior a esta, até o gene da spermina sintase, que é o gene mais próximo de PHEX no sentido 5' (Grieff *et al.*, 1997 Sep); e a caracterização do promotor murino (Hines *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001).

A partir da caracterização da região promotora do gene PHEX de camundongos, identificou-se que o fator de transcrição SOX9, o mais importante fator de transcrição para a condrogenese, é capaz de se ligar a este promotor e estimular a expressão de PHEX (Liu *et al.*, 2001).

Também foi determinado que uma nova proteína nuclear de 110 kDa (PAP110) é capaz de se ligar ao promotor murino e é, provavelmente, necessária para a transcrição basal de PHEX (Hines *et al.*, 2004). O metabólito da vitamina D, a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, é conhecido como sendo capaz de inibir a mineralização da matriz óssea e regular negativamente a expressão de PHEX, de forma tempo e dose dependente (Ecarot e Desbarats, 1999). Hines e colaboradores (2004) demonstraram que esta inibição se deve a repressão da expressão de PAP110. Aparentemente, o gene codificador de PAP110 possui um elemento responsivo ao receptor nuclear de vitamina D, que é o responsável pela inibição da expressão de PAP110 na presença de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Hines e colaboradores (2002) demonstraram que glicocorticóides, que sabidamente influenciam a homeostase de fosfato e a mineralização óssea, induzem um aumento na expressão de PHEX. Essa indução, provavelmente é um resultado da remoção do fator de transcrição de osteoblasto Cbfa1 do promotor murino. Provavelmente, Cbfa1 seja importante para a inibição da expressão de PHEX em osteoblastos não maduros.

A caracterização da região promotora do gene PHEX humano poderá contribuir para a determinação dos mecanismos regulatórios envolvidos no controle da expressão do gene, ampliação dos conhecimentos a respeito de suas funções além de possibilitar um melhor entendimento dos elementos de patogenicidade do *M. leprae*.

## **II. OBJETIVOS**

Devido à ausência de dados na literatura com relação as prováveis regiões regulatórias do gene PHEX humano, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar a região promotora deste gene.

Assim nossos objetivos específicos são:

- Identificar a provável região promotora do gene PHEX através da análise por bioinformática, utilizando-se ferramentas disponíveis na internet.
- Clonar a provável região promotora do gene PHEX e partes dela no vetor pGL3-Basic.
- Transfectar os vetores recombinantes em células de Schwann ST88-14 e em culturas primárias de osteoblastos humanos.
- Determinar se a porção clonada é suficiente para a indução da expressão do gene PHEX humano em células de Schwann ST88-14 e em osteoblastos através da análise da atividade da luciferase.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1. ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA**

Inicialmente foi realizada uma pesquisa bibliográfica utilizando-se o site PubMed (<http://www.pubmed.com>) sobre o promotor do gene PHEX. Após esta pesquisa, a seqüência do já caracterizado promotor de PHEX murino, bem como as seqüências dos genes PHEX de humano e de rato foram adquiridas através do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Selecionou-se, então, um fragmento de 4498 bp à frente do início da fase de leitura aberta do gene PHEX humano. Esta região foi analisada através de ferramentas de bioinformática, incluindo, principalmente, o programa Genomatix Eldorado 3.0.2, disponível no site da GENOMATIX (<http://www.genomatix.de/>).

Uma região de 1046 bp que é um pouco maior do que a identificada pelo programa Eldorado como sendo a região promotora do gene PHEX humano e parte da seqüência do gene PHEX de rato foram, então, alinhadas ao promotor murino. Para isso foram utilizados a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e o programa DiAlign (GENOMATIX).

O fragmento de 1046 bp foi analisado pelo programa ModelInspector professional Release 4.8.2 (GENOMATIX) para confirmação dos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição já identificados na seqüência de 4498 bp.

#### **2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE CULTURAS DE CÉLULAS**

Após o crescimento das células humanas (osteoblastos ou células de schwann ST88-14) em garrafas de cultura pequenas (NUNC), as células eram tripisinizadas (conforme descrito no item 15 – Material e Métodos) e lavadas por 2 vezes com PBS. As células eram, então, ressuspensas em 980 µL de tampão SNET (20 mM de Tris-HCl pH8.0, 5mM de EDTA pH 8.0, 400 mM de NaCl e 1% de SDS) e adicionava-se Proteinase K para uma concentração final de 400 µg/mL. As amostras eram incubadas por uma hora e trinta minutos a 50°C e, após este período, adicionava-se o mesmo volume da amostra de fenol saturado com TE e agitava-se em gangorra por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras eram, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa era transferida para um novo tubo e adicionava-se o mesmo volume da amostra de fenol saturado com TE e de clorofórmio: álcool isoamílico, agitava-se gentilmente e centrifugava-se a 12.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa era então precipitada com um volume de isopropanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M por 16 horas a -20°C. As amostras eram, então, centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O DNA era colocado a temperatura ambiente para secar e depois ressuspensão em TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.0 e 1 mM de EDTA pH 8.0).

### 3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar a região de 1046 nucleotídeos, bem como diferentes fragmentos desta região contendo deleções sucessivas de 100 pares de bases na região 5'. Os oligonucleotídeos utilizados nestas reações de PCR foram sintetizados pela Molecular Resources (Colorado State University), e suas seqüências encontram-se descritas na **TABELA 1**.

As condições de PCR empregadas foram: mistura reacional composta de tampão de PCR 1X (Promega), 0,4 µM do oligonucleotídeo anti-senso e 0,4 µM de um dos oligonucleotídeos senso, 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 ng de DNA genômico humano, 100 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Amersham Biosciences) e MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de 25 µL ajustado com água deionizada estéril.

As concentrações de MgCl<sub>2</sub> utilizadas para cada par de oligonucleotídeos foram determinadas após uma etapa de padronização da PCR e encontram-se listadas na **TABELA 1**.

Os tubos contendo a mistura reacional foram colocados no termociclador MJ Research, Inc, e submetidos a uma pré-desnaturação (5 minutos a 94°C), seguida de 45 ciclos contendo três fases: desnaturação a 94°C por 40 segundos, pareamento de oligonucleotídeos por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O programa foi concluído com um ciclo adicional de 7 minutos a 72°C.

As temperaturas utilizadas para o pareamento de cada par de oligonucleotídeos foram determinadas após a realização de alguns testes de padronização das condições de PCR, e encontram-se listadas na **TABELA 1**.

**TABELA 1: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.**

Oligonucleotídeos senso	Seqüências	MgCl <sub>2</sub>	Temperatura de pareamento
----------------------------	------------	-------------------	------------------------------

1046	5' CGTGGGCCACTACGCCCGGCCTGAA 3'	1 mM	60°C
-100	5' GAATGGCTGCCTCAGTAGGAGTGGC 3'	2 mM	60°C
-200	5' AATAAACTTAATTCACGCACTTGTG 3'	1mM	60°C
-300	5' AAAAGTTCCAGTTCAAACCATCAGC 3'	2 mM	58°C
-400	5' AAAGTTCCTGAAATAAAAATGCTCCA 3'	2 mM	58°C
-500	5' CAGGCAAGCAGAATGATTCTTGCAA 3'	0,75mM	62°C
-600	5' GAGTTTCACGAGAATCCAGTTTTGA 3'	1 mM	62°C
-700	5' AACATATATACTCGGAACGCTTGAG 3'	2 mM	58°C
-800	5' AGGGGGAAAGCCAAGGCAACCAATA 3'	2 mM	58°C
-900	5' TTCTTAAGCTGTCCATTAGTAGAAG 3'	2 mM	58°C

---

***Oligonucleotídeo  
o anti-senso***

---

*Seqüência*

PHEX anti-senso 5' CGCTGCTCCCTGTTTCTGCTTCCAT 3'

---

Para facilitar o processo de clonagem do fragmento de 1046 nucleotídeos e da região contendo menos 500 pares de bases (fragmento -500) do que o primeiro fragmento, no vetor de interesse, novos oligonucleotídeos foram desenhados, contendo sítios de restrição para as enzimas *XhoI* ou *HindIII*, possibilitando assim uma clonagem direcionada dos fragmentos. Estes oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen Custom Primers e suas seqüências encontram-se na **TABELA 2**.

**TABELA 2: Seqüências dos oligonucleotídeos contendo sítios de restrição.**

---

Oligonucleotídeos	Seqüências
Senso	

---

1046 ( <i>Xho</i> I)	5' TGGGAT' <u>CTCGAG</u> CGTGGGCCACTACGCCCCGGCCTGAA 3'
-500 ( <i>Xho</i> I)	5' ATGAAG <u>CTCGAG</u> CAGGCAAGCAGAATGATTCTTGCAA 3'
Oligonucleotídeo	Seqüência
anti-senso	
( <i>Hind</i> III)	5' CTTTCCAGA <u>AAGCTT</u> CGCTGCTCCCTGTTTCTGCTTCCAT 3'

\* As letras sublinhadas indicam os sítios de restrição. Entre parênteses encontra-se a enzima de restrição correspondente a cada oligonucleotídeo.

Para estes oligonucleotídeos as condições de PCR empregadas foram: mistura reacional composta de tampão de PCR 1X (Clontech), 0,4 µM do oligonucleotídeo anti-senso e 0,4 µM de um dos oligonucleotídeos senso, 0,3 µL de Advantage cDNA polymerase mix (Clontech), 200 ng de DNA genômico humano, 100 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Amersham Biosciences) e 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de 25 µL ajustado com água deionizada estéril.

As misturas foram submetidas a uma pré-desnaturação por 10 minutos a 94°C, seguida de 45 ciclos compostos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento de oligonucleotídeos a 65°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida as misturas passaram por ciclo adicional de 7 minutos a 72°C.

Em todos os experimentos foi feito um controle negativo, que consistiu em uma mistura reacional sem adição de DNA, para confirmação da ausência de DNAs contaminantes presentes nas soluções utilizadas.

Alíquotas dos produtos das reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmação da presença do produto de interesse e da especificidade da reação, assim como uma estimativa da quantidade de produto formado.

#### 4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel foi preparado adicionando-se agarose ao TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA pH 8.0) na proporção de 0,8; 1,0 ou 2,0 g de agarose (Sigma) para 100 mL de tampão, correspondendo às concentrações de 0,8; 1,0 ou 2,0%, respectivamente. A solubilização foi feita em microondas por cerca de um minuto e meio e o volume final ajustado com água destilada. Em seguida, a solução de agarose foi esfriada e despejada no formador previamente montado com o pente para formação dos “poços” de aplicação das amostras. Após gelificação, o pente foi retirado e o gel foi transferido para a cuba de eletroforese horizontal (HOEFER HE33). Um volume de TAE 1X suficiente para cobrir o gel foi adicionado à cuba.

As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% – SIGMA – e glicerol 50% – USB – em água destilada) ao material a ser analisado. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por, aproximadamente, 1 hora. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e corado por 10 minutos. Os géis foram então fotografados utilizando-se um sistema de registro de imagens (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 1D 3.6).

## **5. DIGESTÃO DOS INSERTOS E DO VETOR**

Os produtos das reações de PCR realizadas com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição (aproximadamente 6 µg de DNA), bem como 4 µg do vetor pGL3-Basic foram digeridos com 10 U de cada uma das enzimas *XhoI* e *Hind III* (Invitrogen) por aproximadamente 16 horas a 37°C, em uma reação contendo tampão React 2 1X (Invitrogen), em um volume final de 20 µL ajustado com água deionizada estéril.

## **6. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CLONAGEM DO GEL DE AGAROSE**

Após digestão, os produtos das reações de PCR e o vetor pGL3-Basic foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, seguido de coloração com brometo de etídeo (item 4 – Material e Métodos). As bandas dos géis correspondentes aos tamanhos desejados foram cortadas do gel de agarose com lâminas de bisturi estéreis, expondo-se tais bandas o mínimo tempo possível à luz UV. Após a obtenção dessas bandas, o DNA foi purificado utilizando-se o Quiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Uma alíquota do DNA purificado foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% para mensurar a concentração de DNA.

## **7. GERAÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES**

Trezentos nanogramas de inserto e 390 ng de vetor digeridos e purificados foram ligados utilizando-se 10 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) em um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas. Em seguida, precipitou-se as reações com 2,5 volumes de etanol gelado e 5 µg de tRNA a -20°C por uma noite. Centrifugou-se por 15 min a 12000 x g a 4°C, retirou-se o sobrenadante, adicionou-se etanol a 70%, centrifugou-se novamente, como descrito anteriormente, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o plasmídeo recombinante em 5 µL de água deionizada estéril.

## **8. PREPARO DE CÉLULAS DE *E. coli* ELETROCOMPETENTES**

Uma pequena alíquota de *E. coli* (JM109 - Promega) foi crescida em 10 mL de meio LB (Gibco-BRL) a 37°C, sob agitação, por uma noite. No dia seguinte 1,5 mL do pré-inóculo foi colocado em cada um dos quatro Erlenmeyers contendo 150 mL de meio LB cada e manteve-se sob agitação constante a 37°C, acompanhando-se o crescimento mensurando-se a D.O.<sub>600</sub> a cada 30 minutos, até que as culturas atingissem a D.O.<sub>600</sub> 0.6.

As culturas foram incubadas por 10 minutos no gelo e, posteriormente, transferidas para tubos de centrífuga Beckman (J2-21M/E) estéreis e gelados. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se gentilmente cada precipitado em 200 mL de glicerol 10% (USB) estéril gelado e centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min. a 4°C. Repetiu-se este procedimento mais uma vez e então o sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se cada precipitado de células em 25 mL de Glicerol 10% gelado estéril, juntando-se cada duas culturas em um tubo pequeno de centrífuga Beckman. As células foram centrifugadas a 3700 rpm por 10 min e cada precipitado celular homogenizado em 4 mL de Glicerol 10% gelado estéril, fez-se alíquotas de 50 µL em tubos de microcentrífuga e estocou-se a -70°C.

## **9. TRANSFORMAÇÃO DE CEPAS DE *E. coli***

Para a transformação das células eletrocompetentes adicionou-se os 5 µL da reação de ligase precipitada ao tubo contendo 50 µL de bactérias, misturou-se gentilmente, transferiu-se esta mistura para cubeta de eletroporação e submeteu-se a uma diferença de potencial de 2,5 KV por alguns segundos em eletroporador (BioRad). Adicionou-se rapidamente 400 µL de



meio SOC (triptona 2% - Sigma -, extrato de levedura 0,5% - Gibco-BRL -, NaCl 0,05% - Sigma -, KCl 0,019% - Sigma -, MgCl<sub>2</sub> 20mM e 20 mM de glicose - Sigma) e incubou-se por 1h sob agitação a 37°C. Plaqueou-se 50 e 200 µL em LB Agar com 100 µg/mL de ampicilina. Incubou-se a 37°C pernoite.

Os plasmídeos pGL3-Basic, pGL3-Control e pRL-TK (descritos no item 14 –Material e Métodos) também foram transformados nas células JM109 por eletroporação para sua perpetuação em nosso laboratório.

## **10. MÉTODO DE SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES**

Algumas das colônias obtidas após transformação foram escolhidas de forma aleatória, ressuspensas em 5 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina e cultivadas a 37°C, sob agitação, por uma noite, para obtenção de massa bacteriana para a extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep).

## **11. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINI-PREP)**

Após o crescimento das bactérias, uma pequena alíquota das mesmas foi misturada a 20% de glicerol e armazenada a -70 °C. O restante da cultura foi, então, centrifugado em microcentrífuga a 12000 x g por 1 min e o sobrenadante descartado. O precipitado de cada cultura foi ressuspensão em 150 µL de solução de lise (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA e 50 mM de glicose). As amostras foram homogenizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A esta suspensão adicionou-se 300 µL de tampão de lise alcalina (0,2 N de NaOH 200 mM e 1% de SDS), misturou-se por inversão e incubou-se por 5 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 225 µL de acetato de potássio (3 M, pH 4.8) gelado, misturou-se suavemente e incubou-se em gelo por mais 5 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e incubado então a 37°C por 30 minutos com RNase livre de DNase (20 µg/mL). Após este período, adicionou-se o mesmo volume da amostra de fenol saturado com TE e de clorofórmio: álcool isoamílico, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se a 12.000 x g por 2 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o mesmo procedimento foi repetido utilizando-se apenas clorofórmio: álcool isoamílico. A fase aquosa foi então precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto por 20 minutos a -70°C, novamente centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, e o precipitado lavado com etanol 70%. Após esta lavagem o material foi novamente centrifugado, e o DNA plasmidial ressuspensão em água deionizada estéril.

Alternativamente, a extração de DNA plasmidial foi realizada com o Wizard plus SV minipreps DNA purification System (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante. Esse procedimento não utiliza fenol, gerando assim um material mais puro, ideal para ser seqüenciado ou transfectado em células eucarióticas.

## **12. DIGESTÃO PARA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS VETORES**

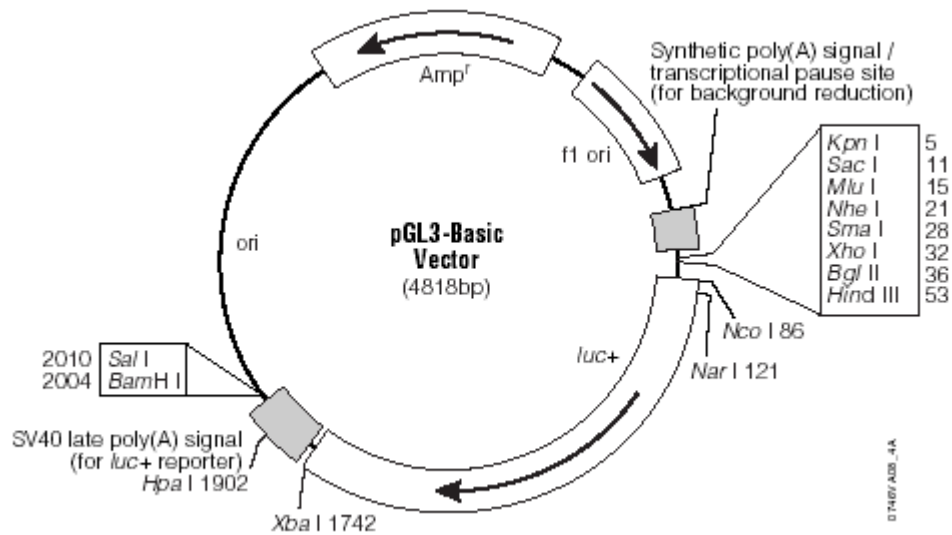
Após a purificação os plasmídeos foram dosados em espectrofotômetro a 260nm, submetidos a uma digestão com enzimas de restrição apropriadas e analisados em gel de agarose 0,8%. Assim, os plasmídeos pGL3-Basic e pGL3-Control foram tratados com a enzima *SmaI* e o plasmídeo pRL-TK com a enzima *EcoRI*, para confirmação da identidade do plasmídeo através do tamanho. O vetor pGL3-Basic recombinante foi digerido com as enzimas *XhoI* e *Hind III* (Invitrogen) para a liberação do inserto. Os resultados das digestões foram visualizados em gel de agarose 0,8 % (item 4 – Material e Métodos).

### 13. SEQUENCIAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES

Os vetores pGL3-Basic recombinantes que liberaram insertos após a digestão com as enzimas de restrição foram, então, seqüenciados através do programa PDTIS/FIOCRUZ, para a confirmação da clonagem do fragmento desejado. Para isso foram utilizados os oligonucleotídeos 1046, -500 e anti-senso, além do oligonucleotídeo anti-senso GL2 que é específico para os vetores pGL3. A seqüência deste oligonucleotídeo é: 5' CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA 3'.

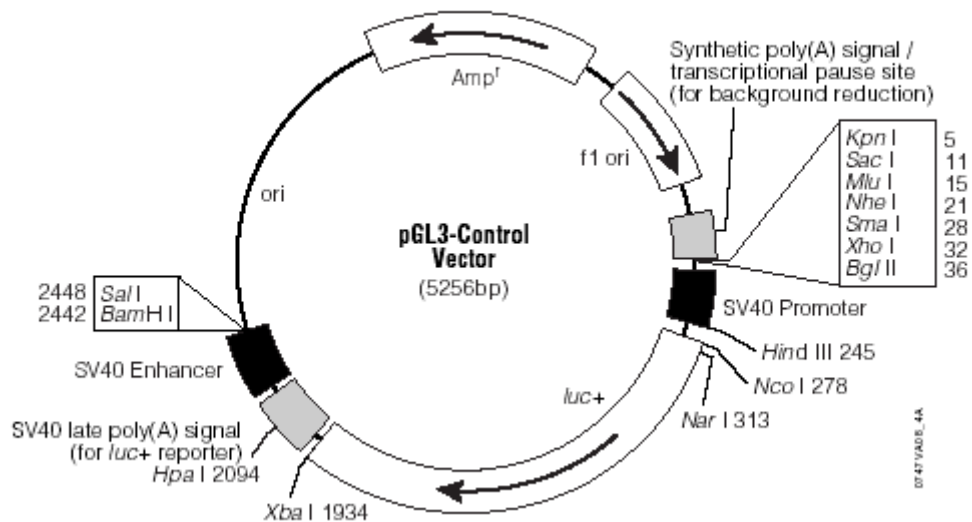
### 14. VETORES EMPREGADOS

**Vetor pGL3-Basic (PROMEGA)** – Este vetor não possui promotores eucarióticos ou outras seqüências regulatórias, além disso, ele contém a região codificante da luciferase de vaga-lumes (*Photinus pyralis*) que permite o monitoramento da atividade transcricional em células eucarióticas. Assim, as seqüências amplificadas por PCR podem ter a sua atividade promotora mensurada através da clonagem das mesmas neste plasmídeo, transfecção dos vetores recombinantes em células eucarióticas e posterior quantificação da atividade da luciferase.



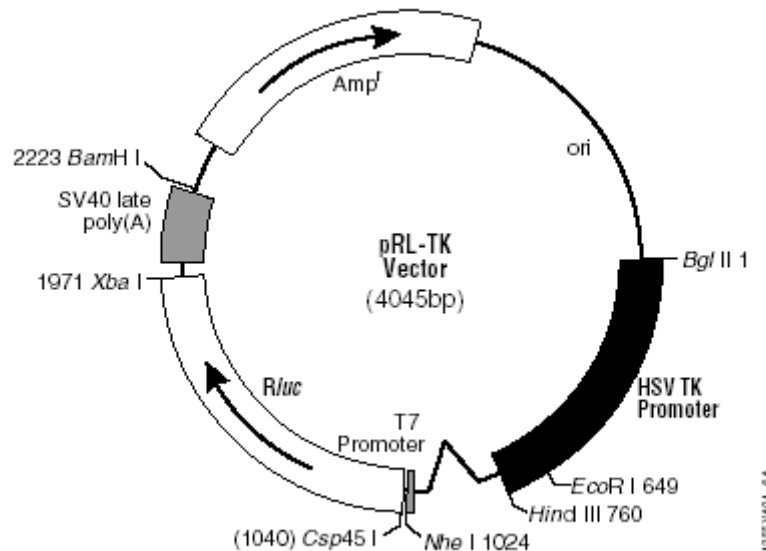
**FIGURA 3: Mapa do Vetor pGL3-Basic.** luc+: cDNA codificador da enzima luciferase de vaga-lume; Amp<sup>r</sup>: gene que confere resistência à ampicilina em *E. coli*; f1 ori: origem de replicação derivado de filamentos phage; ori: origem de replicação em *E. coli*.

**Vetor pGL3-Control (PROMEGA)** – Este vetor contém o promotor SV40 e seqüências regulatórias, resultando em uma forte atividade luciferase em vários tipos de células de mamífero, sendo assim, uma excelente ferramenta para o monitoramento da eficiência de transfecção. Assim, as células utilizadas foram transfectadas separadamente com este plasmídeo para avaliar o impacto que a expressão da luciferase de vaga-lumes poderia causar em cada tipo celular.



**FIGURA 4: Mapa do Vetor pGL3-Control.** luc+: cDNA codificador da enzima luciferase de vaga-lume; Amp<sup>r</sup>: gene que confere resistência à ampicilina em *E. coli*; f1 ori: origem de replicação derivado de filamentos de fagem; ori: origem de replicação em *E. coli*.

**Vetor pRL-TK (PROMEGA)** – Este vetor contém a região codificante da luciferase do organismo marinho *Renilla reniformis* e o promotor timidina quinase do vírus herpes simples (HSV-TK) para promover uma expressão moderada de *Renilla* luciferase. Este plasmídeo foi cotransfectado juntamente com os plasmídeos pGL3-Basic Vector ou pGL3-Control Vector, como um controle para normalização das variações experimentais, reduzindo falsos positivos e falsos negativos causados por fatores não específicos como citotoxicidade, número de células, viabilidade celular e eficiência de transfecção.



**FIGURA 5: Mapa do Vetor pRL-TK.** R luc: cDNA codificador da enzima luciferase de *Renilla reniformis*; Amp<sup>r</sup>: gene que confere resistência à ampicilina em *E. coli*; ori: origem de replicação em *E. coli*.

## 15. MANUTENÇÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN DA LINHAGEM ST88-14 E DA CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEÓBLASTOS

A linhagem de células de Schwann ST88-14 foi doada pelo Dr. Jonathan A. Fletcher do Departamento de Patologia do Brigham and Womens's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA. Tendo sido isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I. Esta linhagem era cultivada em meio RPMI 1640 (Invitrogen) com 10mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomina, 1 mM de L-Glutamax (Invitrogen) e 10% de soro fetal bovino (CULTILAB).

A cultura primária de osteoblastos proveniente do Banco de Células Humanas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ) foi doada pelo Dr. Fernando Costa e Silva e era cultivada em Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DEMEM - GIBCO) suplementado com 20 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomina, 8mM de bicarbonato de sódio, 0,15 g/L de ácido ascórbico e 10% de soro fetal bovino.

As células eram estocadas em alíquotas, no nitrogênio líquido, em solução contendo 50% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Sigma). Para o cultivo, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, ressuspensas em 10 mL de meio, centrifugadas a 500

x g por 10 min para a retirada do crioprotetor e ressuspensas novamente em meio. As culturas eram mantidas em garrafas de cultura (NUNC) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, até obterem uma confluência de aproximadamente 70%.

Tanto as células de ST88-14 quanto os osteoblastos são células aderentes, por isso para se fazer o repique o sobrenadante da cultura era retirando, a monocamada lavada com PBS. Um mL de Tripsina (0,125%) com 0,2% de EDTA (Invitrogen) era adicionada a cultura e as células eram mantidas a 37°C por 2 minutos. Logo após adicionava-se meio e a suspensão de células era centrifugada por 10 minutos a 500 x g. As células eram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e aproximadamente 3,5 x 10<sup>5</sup> células eram transferidas para uma nova garrafa. Após a sexta passagem, as culturas eram desprezadas e nova alíquota de células era descongelada.

## **16. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO**

As células de Schwann e os osteoblastos foram transfectados com os vetores utilizando-se o Tfx™ Reagent (PROMEGA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Este reagente é composto por uma mistura de lipídios catiônicos sintéticos que formam vesículas que se associam ao DNA, facilitando a entrada do mesmo nas células pela fusão das vesículas com a membrana celular.

Após tripsinização, 10 mil células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo chato (Becton Dickinson) e crescidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. O DNA foi misturado ao meio sem soro e ao Tfx™<sup>20</sup> Reagent, essa mistura foi agitada vigorosamente e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Retirou-se o meio das células por aspiração e, então, as células foram incubadas por uma hora com 40 µL da mistura por poço, a 37°C (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>). Passada uma hora, adicionou-se em cada poço 60 µL de meio com 15% de soro fetal bovino e incubou-se novamente as células por 48 horas.

Diferentes concentrações de DNA foram testadas (0,5 e 1 µg), utilizando-se sempre uma proporção de cargas de 2:1 (Tfx:DNA).

## **17. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE**

A análise da atividade das luciferases de vaga-lume e de Renilla foi feita com o Dual-Glo™ Luciferase Assay System (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante.

Assim, retirou-se todo o meio das células e adicionou-se uma mistura de 20 µL de meio com 20 µL de Dual-Glo Luciferase Reagent (Promega), por poço. Este reagente induz a lise celular e funciona como substrato da luciferase de vaga-lume. Incubou-se as células por 10 minutos com o reagente e mensurou-se a luminescência gerada em luminômetro (Lmax II<sup>384</sup> – Molecular Devices Corporation).

Para medir-se a luminescência da luciferase de Renilla, adicionou-se em cada poço 20 µL de Dual-Glo Stop and Glo Reagente (Promega). Este reagente reduz a luminescência de vaga-lume em pelo menos 10000 vezes, e contém o substrato da luciferase de Renilla. Após 10 minutos da adição do reagente, foi realizada a leitura em luminômetro.

## IV. RESULTADOS

### 1. ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA

Na pesquisa bibliográfica sobre o promotor do gene PHEX, realizada através do site PubMed, verificou-se que Hines e colaboradores (2000) e Liu e colaboradores (2001), separadamente, caracterizaram o promotor do gene PHEX de camundongo. Com isso, o já caracterizado promotor de PHEX murino, bem como as seqüências dos genes PHEX de humano e de rato foram adquiridas através do site NCBI e selecionou-se um fragmento de 4498 bp à frente do início da fase de leitura aberta do gene PHEX humano, terminando sete nucleotídeos após o códon de iniciação (ATG). O fragmento de 4498 bp foi, então, analisado através de ferramentas de bioinformática. A **FIGURA 6** mostra o resultado obtido através da análise desta seqüência com o programa Genomatix Eldorado 3.0.2, que foi capaz de identificar uma região promotora de 1031 bp neste fragmento. A **FIGURA 7** mostra o resumo deste resultado de forma esquemática, e a **TABELA 3** apresenta informações sobre as famílias de fatores de transcrição que possivelmente possuem sítios de ligação no provável promotor, de acordo com o programa Eldorado. As posições dos sítios de ligação desses fatores de transcrição em relação ao fragmento de 4498 bp encontram-se na **FIGURA 6**.

---

```
LOCUS      NT_011757_180132      4498 bp      DNA
DEFINITION Fragment of sequence NT_011757 extracted from pos. 18013201 - 18017698
           on chromosome X.
ACCESSION  ?
COMMENT    Genomatix ElDorado 3.0.2
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..4498
                               /organism="Homo sapiens"
                               /chromosome="X"
           repeat_region   <1..78
                               /name="ALU"
           variation       112..112
                               /allele="C"
                               /allele="A"
           variation       127..127
                               /allele="T"
                               /allele="C"
           variation       189..189
                               /allele="G"
                               /allele="A"
           variation       196..196
                               /allele="T"
```



```

variation      /allele="C"
               330..330
               /allele="C"
variation      /allele="A"
               461..461
               /allele="T"
               /allele="C"
SMAR          566..890
               /note="3523 bp upstream of PHEX
               (NM_000444)."
```

```

variation      649..649
               /allele="T"
               /allele="A"
variation      675..675
               /allele="G"
               /allele="A"
repeat_region  complement(1532..1712)
               /name="ALU"
variation      1552..1552
               /allele="T"
               /allele="C"
repeat_region  complement(1791..2018)
               /name="ALU"
repeat_region  complement(2118..2340)
               /name="ALU"
variation      2368..2368
               /allele="A"
               /allele="G"
variation      2919..2919
               /allele="A"
               /allele="C"
repeat_region  complement(3232..3457)
               /name="ALU"
promoter      3468..>4498
               /gene="Promoter for Loc5251 (transcripts:
               PHEX/NM_000444) "
               /note="annotation by Genomatix"
Module        3587..4083
               /name="SMAD_EBOX_02"
Module        complement(3629..3653)
               /name="CEBP_NFAT_01"
Module        3990..4015
               /name="HOXF_HOXF_01"
Module        4057..4075
               /name="EGRF_SP1F_01"
Module        complement(4096..4125)
               /name="TTFE_FKHD_01"
variation      4111..4111
               /allele="C"
               /allele="A"
               /note=" Hits promoter  for Loc5251"
Module        4113..4244
               /name="NKXH_NKXH_GATA_01"
Module        4180..4214
               /name="TTFE_FKHD_01"
Module        4180..4194
               /name="PAX8_TTFE_01"
Module        4324..4353
               /name="CEBP_EGRF_01"
Module        4363..4395
               /name="CEBP_STAT_01"
variation      4399..4399
               /allele="G"
               /allele="A"
               /note=" Hits promoter  for Loc5251"
prim_transcript 4413..>4498
               /gene="PHEX"
               /product="phosphate regulating gene with
               homologies to endopeptidases on the X
               chromosome (hypophosphatemia vitamin D
               resistant rickets)"
```

```

exon /transcript_id="NM_000444"
4413..>4498
/gene="PHEX"
/number="1"
5'UTR 4413..4488
/gene="PHEX"
variation 4456..4456
/allele="T"
/allele="C"
/note=" Hits promoter for Loc5251 Overlap
with 5'UTR of PHEX/NM_000444."
BASE COUNT 1168 a 1003 c 967 g 1360 t
ORIGIN

```

```

1 GATGAGGCAG GAGAATCGCT TGAACCTGGG AGGTGGAGGT TGCAGTGAGC CGAGATTGCG
61 CCACTGCACT CCAGCCTGGG CAACAGAGCG AGACCCTGTC TCAAAACAAA ACAAAAAGGT
121 GAAAAACAAA AAAAGCTTTA TTTACAAAA CAGGCAGTGG GCCAAATTTG GCCCATGTAC
181 TCTTGTGTAC AGACCCCTGC TTTAGTCTGT TGAGCACCTA TTATTTCCCT GTGCTTTGAA
241 CTTCTTTTAT TTGCCCTAAA GGGTTTTTTT TCTTTTCTTT TTTTTTCCG TGTTACTTTA
301 AGTGTGGTGT ATTTTGAGGG CAAGATAATC ATCATCTCCT AAAAGGCTGA AAAATTAATG
361 CAGAAAATGG CACAGAATGA ACAATGTACC TTGTAATGAA TGATTCTCC ACATCCTTC
421 CTCTGTCTGT CCCGCCACT TCAAGTTTC CTTTATTCCT CTGGTGAATA AAAGAAACCT
481 TCATTACATT ACATTACACA AATTATGCTT ATTTTCAATA TTTTGACAGT TCTATATTAC
541 TCTTACAGAC TTGTTTTTCAT TGTTCAAGTA ATACATTTTA AAATTACTTT TTTTAATTTT
601 TAATTTTTTGT GGGTACATAT TAGGTGTATA TATTTGTGGG TACATGAGTT GTTTCGATAC
661 AGGCATGCAA TGTGAAATAA TCACATCGTG GTGAATGTGG TATCCATCCC CTCAAGCATT
721 TATCCTTAGT GTTACAAACA ATCCAATGGC AGTCTTTCAG TTATTTTTAA ATTTACAATT
781 AAGTTAAATG AATACATTTT TCTATCTGTG TTTGCATATC TTAGTTTGGG ATAGAATGCA
841 TCATAATTTT CCTATTACAA TTAATGAAAG TATTTTTTTT GGTTTAATGG CTTTTCACTC
901 AGCAGTTGAC CGTTCAGGAA TGAATTCCTG TCGGTAAGTG ATGGGTAGGT ATAACCTCAG
961 GGAATCCCA AATTGCCCTC ACCTCTGGGG GAATTGCAAG TTCAAGGCAG GTGAAGGCTA
1021 CTCCAGCTAG GAACTCACGG CCACTATTCA ATGTCAGTGG GGACACTGAA AGTTGTGAGG
1081 AGATTGAGAG GAGGAAGGAA AGAGGAAAGA AGTGAGTCCT GGTGTCGTGC TTGGGTGACT
1141 GTCCTCTCGC TGTGCACAGG AAGCTTTGTC AAGCAGCAGA CATGCCATGT ATGGCAATGA
1201 TCCCATCCCC CATCTATCCA TTTGTGATT TCCCATGCCA CCTGAGGCCA TACCTTGCTC
1261 TCAGTGTCTT TATTTGTGAA ACAGAGTTAA AATACCTTTG CTATCAAGTA TGTAGATTTA
1321 CCATGAGGTT AAAGCGAATG TGCTATGCCT ATATGAAGTA TCACTTTTAG TTGAGCATTG
1381 AGAAGGAATA ATTAGGGCCT TGAAAGATGA CACCCTTCCT CCCCCGCG ACATTAGCAT
1441 GTGAGGTTCC TGAAGCTGAA GCTGGTTGTT TGTTGTTTTG TGTTGTTGTT GTCGTTGTTG
1501 TTGTTTTGAG ATGGGGTCTC GCTCTGTTGC CCAGGCTGGA GTGCAGTACT GCGCATCTCAG
1561 CTCACTGCAA CCTCCGCCTC CCGGGTTCCA GTGATTCTCC GATTCTCCTG CACTACCTC
1621 CCGAGTAGCT GGCATTACAG GCATCCACCA CCACCTCCG CTAATTTTTG TACTTTTCTG
1681 AGAGTCGGGG TTTGCGCCATG TTGGCCAGGC TGATCTCGAA CTCCTGACCT CAGGTGATCC
1741 ACCCACCTTG GCCTTTTGGT TTTTTTGAGA CACAGTTTCA TTCTGTCACC CAGGCTGGAG
1801 TGCAGTGGCT CAATCTCAGC TCACTGCAGC CTCCACTTCC CAGGTCCAG CGATTTTTGT
1861 GCCTCAGCTT CCCCAGTAG CTGGGATTAC AGTCACGTGC CACCACACCT GGCTAATTTT
1921 TGTATTTTGA GTAGAGACAG GGTTCGCCA CATTGGCCAG GCAGATCTCG AACTCCTGAC
1981 TTAGAGTGAT CTGCCACCT CAGCCTCCA AAGTGTGGG ATTACAGGTT TGAGCCACCA
2041 CTTCTGGCCC CGAAGTTGGT TTTTTGTTTT GTTTTGTTTT GTATTTGTTT TTTTCCAGAC
2101 AGTCTTGCTC TGCCGCCAG ACTAGAGTTC AGTGGCATGA TCTCAGCTCG CTGCAACCCG
2161 CCTCCTGAGT TCAAGCAACT CTCCTGCCTC AGTCTCCTGA GTAGCTGGGA TTACAGGCGC
2221 CTGCTACCAC GCCCGGCTAT TTTTTGTAT TTTAGTAGAG ACAGGGTTTC ACCATGTTGG
2281 CCAGGCTGGT CTCGAACTCC TGACCTCGTG ATCCACCCGC CTTGGCCTCC CAAAGTACTG
2341 GGATTACAGG CGTGAGCCAC TGCGCCAGC TGAAGCTGGT TGTTAAGAT AAGTGGCTAG
2401 GGCTAACTTG TATGATTTTT ATTGCTCTCC TTTTCACTGT GAAGGGCCAG GAAATGTGCA
2461 TGTTGGAGCT GCAACATTGA ACATGGTTCC TGACTTTGTG GAACTCATGG TCTAAGATGT
2521 GTTCTAGAGT GAGGTCCAAA AACTCTTGGG AGAATCCCAT ACTAGGGGCC AAAGTCTTGC
2581 TAGGGTGTGT TATGGAATAA CAGCAACAAA ATAATGTCAA CAGCCAATGA GCACAGGATA
2641 ACTACAACAC ACCATGATGT CATAACTTGG ACAAAGGCTT GTGACCCCTT GACTTTGGCG
2701 CAACATGAAA TGAGCAGAAA GTAAGGTATA TTATGGAATA AGCCCCAAA CTTGAGAGAA
2761 TCCCATGCTA AGGGCTTAAG CCCTGACCAA GACAAGCCAG ACAGGACCAT TACTGTGTGG
2821 CCATGTTATA CTGAGCTCAT CAGCACCTGC TGAGCTCCTG TGTCACCTCT AAAGCCATGC
2881 GCACAAGTTT TGCATTGAGA TAATTGCTCT ACTGGTTTCT AGATATAGTT GAATCTTCCA
2941 CCCCCACTCC CACTGCCCTA TGACCTCCAG CAAAACAAA GCAGGTAGGT AGTAATTGTG
3001 TTGTGAGTTA ACGATATCTA TATCTTTGGA TAATAAAATC TATATCATTT CAGTGGTAGC
3061 ATTGGAATAT CAGTTGCCCT TCCCCATGAA GAAAGCACAT TGTTATCGTT TAAATCATTA
3121 TCATAATCAA AAATATCAA GACCCAGTCA TTCATCAGTC TTTCCAGTGA AGTCAACTGC
3181 CTTTGTTTTT TGTTTGTTTA TTTTTGAGAC AGGGTCTCTC TCTCTGTAC CCAGGTTAGA
3241 GTGCAGTGGC GCGATCTGGC TCACTGCAAC CTCCACCTCC CAGGCTCAAG CGATTCTCCC
3301 ACCTCTGCCT CCTGAGTAGC TGGGAATACA GGTGCTCACC AACATGCCG GCTAATTTTT

```

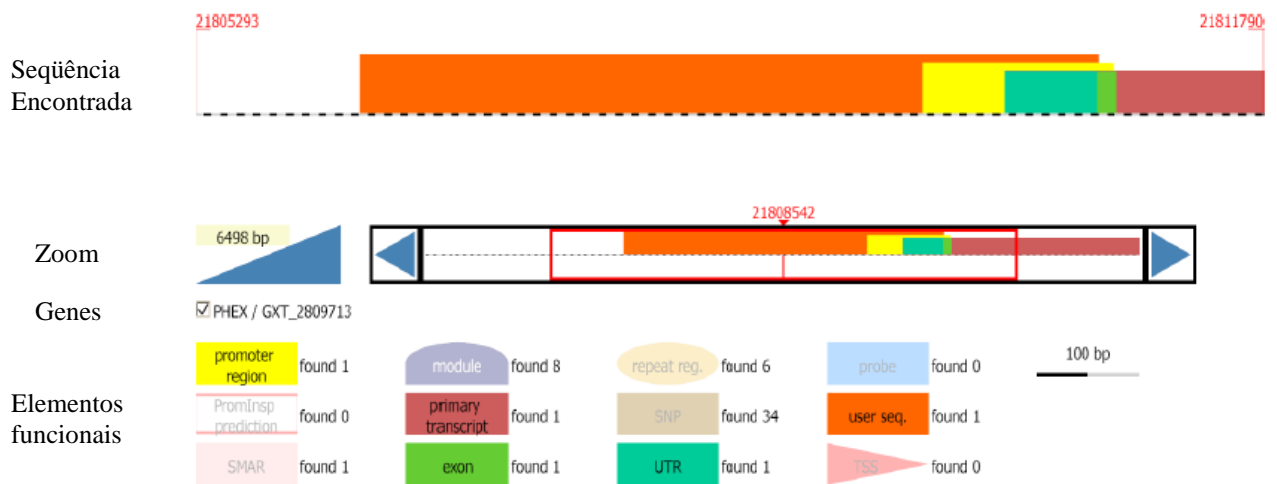
```

3361 GTGTTTTTAG TACAAACAAG GTTTCGCCTT GTTGGCCAGG CTGGTCTCGA ACTCCTGGCC
3421 TCAAGCGAGC CCCCTGCCTC AGCCTCCCAA AGTGCTGGGA TTACAGGCGT GGGCCACTAC
3481 GCCCGGCCTG AAACCAATTG CCTTTGAATT CATCCTGGGG AATCTGCTGA AGTGGACAGT
3541 TTATGTAAAC ACAAAAACAT CCTAATGAAT GGCTGCCTCA GTAGGAGTGG CAGACAAAAC
3601 ACATGGTGCA CTTTTTCATCA AAAACACACA AGGAAAAAAT TTTTCATCAT ATCTTTTGTGTA
3661 GTTGCTAATA AACTTAATTC ACGCACTTGT GTTTTTTTTGT GGGTTTTTTT TTTTGTACAC
3721 TTCTTAGTAC CACAAAGAGG AAGTGCTTTT TCTCCTTCCT TTAAGAAAAA GTTCCAGTTC
3781 AAACCATCAG CCTCTGTAGG TTGTCTTAAT TGCTACTTTG CACTGCCTG GACTATGACT
3841 GATTTTTGGC ACATGCTATC ATACACAAAG TTCCTGAAAT AAAATGCTCC AGGATATCCT
3901 AGGAACTCTT AGAAGGCTT AAAAAGGGAC TCACACACTG AAAGAATATC TTTGATGAAG
3961 ACAATTCAGG CAAGCAGAAT GATTCTTGCA ACAGAATTAC ATGATTAAT GAGATCTTGA
4021 AGTGGGTCCG GTGAATCCTG GCCACCTAAC TTATCATGAT TTGGGGGAGT TTCACGAGAA
4081 TCCAGTTTTG ATAAAACAAT TGTTTTTTTC CTCCCCAAGT GACTATACAT TTAAATAGCT
4141 AAAACATCTG TTCAGCAACA TAGTAAAACA TATATACTCG GAACGCTTGA GAGAAGAGCC
4201 TGCCAAACAG GGACTTTGCT GAGGGAGAGC ACCAAGATAA AGCAACACTG TTTGTTTTGT
4261 CTAGTCAGGG GGAAAGCCAA GGCAACCAAT ATTTTGTTT TTATAATTT CATTGTGAA
4321 GAATTATTTG AGAAAGGGTG GCGAGGGGAG ATTTCTGAC GGCAGTTTCT TAAGCTGTCC
4381 ATTAGTAGAA GAGCAAGAAA GCCTTGGATG TCACGCTG GCTCTTGAGA CCAGCCAGCA
4441 AACACGAAA AGTGAATTC TTCTGTGTG CTCTCTACGG GCCTTCTGAT GGAAGCAG

```

//

**FIGURA 6: Resultado da análise do fragmento de 4498 bp através do programa Genomatrix Eldorado 3.0.2.**



**FIGURA 7: Resultado da análise do fragmento de 4498 bp através do programa Genomatrix Eldorado 3.0.2, representado de forma esquemática.** A seqüência de 4498 bp foi encontrada no cromossomo X de Homo sapiens (NCBI human genome). Região do genoma analisada: NC\_000023 entre 21803542 e 21813541 (10000 bp).

**TABELA 3: Famílias de fatores de transcrição que apresentaram sítios de ligação no provável promotor, de acordo com o programa Eldorado.**

<b>Família de fatores de transcrição</b>	<b>Informações</b>
SMADA	Família SMAD de fatores de transcrição de vertebrados
EBOX	Fatores de ligação E-BOX
CEBP	Proteína intensificadora de ligação a CAAT
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
HOXF	Fatores com atividade moderada em seqüências de DNA conservadas
EGRF	Fator de crescimento do nervo de rápida indução
SP1F	Fatores de seqüências GC
TTFF	Fator de transcrição 1 da tireóide
FKHD	Fatores do início da forquilha de replicação
NKXH	Sítios de DNA conservados NKX/DLX
GATA	Fatores de ligação GATA
PAX8	Sítios de ligação PAX-2/5/8
<i>STAT</i>	<i>Transdutores de sinal e ativadores da transcrição</i>

Uma região do gene PHEX humano um pouco maior do que a região promotora encontrada pelo programa Eldorado, contendo mais 15 nucleotídeos na região 3', totalizando 1046 bp foi alinhada com parte da seqüência do gene PHEX de rato e com o já caracterizado promotor murino. O alinhamento pode ser verificado na **FIGURA 8**, e a identidade obtida entre as seqüências encontra-se na **TABELA 4**. A seqüência do gene PHEX humano analisada apresenta uma identidade de 73% com o promotor do gene PHEX de camundongos,

sugerindo que esta região de 1046 nucleotídeos do gene PHEX humano tem grandes possibilidades de corresponder à região promotora deste gene.

```

hs29804/PHEX          1  cgtggggccac  tacgcccggc  c-TGAAACCA  ATTGCCTTTG  AATTCATCCT
mm90141/Phex         1  gt---TTAAT  CAATCTTTCT  AGTGGAAACCA  AATAAGTCTG  ACTTAATCCT
rn20637/Phex         1  tgtgaTTAAT  CAATCTTTCT  TGTGGGCCCA  GATAAGTCTG  AATTAATTCT

hs29804/PHEX          50  GGGGAATCTG  CTGAAGTGGG  CAGTTTATGT  AAACACAAAA  ACATCCTAAt
mm90141/Phex         48  CAGGAAGCTG  CTGAAATAAC  CACTTTAGGG  AAACATAAAA  CCttacaggg
rn20637/Phex         51  CAGGAAGCTG  CTGAAATAAC  CACTTTAGGG  AAACACAAAA  ACTTGCTAAG

hs29804/PHEX          100  gAA----TGG  CTGCCTCAGT  AGGAGTGGCA  GACAAAACAC  ATGGTgcact
mm90141/Phex          98  cAG----TGT  CTGCTTCGGA  GGAGCTAGAG  AACAAAATAC  ATGGGTGCTG
rn20637/Phex         101  cagaggtTGG  CTGCCTGGGA  GGAGCTAGAG  AACAAAATAC  AAGGGTGTCT

hs29804/PHEX          146  tttcatcaAA  AACACACAAG  GAAAAAAt--  -TTTTCATCA  TATCTTTTGT
mm90141/Phex          144  TGCTCGTCAA  AACACACAGG  Gt--AAAAGA  CTTTTTACTA  TATCGTTTGT
rn20637/Phex          151  TGCTCATCAA  AACACACAGG  GGAAAAAAGA  CTTTTTACTA  TATCGTTTGT

hs29804/PHEX          193  AGTGTCTAAT  AAACCTAATT  Caggcacttg  tgtttttttg  tgggtttttt
mm90141/Phex          192  GGTTGATAAT  AAGCTTAATT  CATATACTTA  ACTGTC----  -----
rn20637/Phex          201  GGTTGATAAT  AAGCTTAATT  CATATACTTA  ACTGTC----  -----

hs29804/PHEX          243  tTTTGTACA  CTTCCTAGTA  CCACAAAGAG  gaagtgcTT  TTCTCCTTCC
mm90141/Phex          228  -CTTGTACA  TTTCTTAGCC  TCACAAAGAG  TAC-----TC  TTCGTCTTCC
rn20637/Phex          237  -TTTGTACA  ATTCTTAGCA  CCACAAAGA-  TAC-----TT  TTCTCTTCC

hs29804/PHEX          293  Ttt-----  AAGAAAAAGT  TCCAGTCCAA  ACCATCAGCC  TCTGTAGGTT
mm90141/Phex          272  Taaaaaaaa  AAAAAAAGT  TCCAGTCCAA  ACCATCAGCC  TCTGTAGGTT
rn20637/Phex          280  T-----A  AAAAAAAGT  TCCAGTCCAA  ACCATC-GCC  TCTGTAGGTT

hs29804/PHEX          336  GTCTTAATTG  CTACTTTGCA  CTGCaTGGA  CTATGACTGA  TTTTGGCAC
mm90141/Phex          322  GTCTTAATTG  CTACTTTGCA  CTGCaTGGA  CTATGACTGA  TTTTGGCAC
rn20637/Phex          321  GTCTTAATTG  CTACTTTGCA  CTGCaTGGA  CTATGACTGA  TTTTGGCAC

hs29804/PHEX          386  ATGCTATCAT  ACACAAaGTT  CCTGAAATAA  AATGCTCCAG  GATATCCTAG
mm90141/Phex          372  ATGCTATCAT  ACACAACGTT  CCTAAAATAA  AATGCTCCAG  GATATCCCAG
rn20637/Phex          371  ATGCTATCAC  ACACAACGTT  CCCAAAATAA  AATGCTTCAG  GCTATCCCAG

hs29804/PHEX          436  GAACTCTTAG  AAGGCTTTAA  AAAGGGACTC  ACACACTGAA  AGAATAtc-T
mm90141/Phex          422  GAACTCTTAG  AAGGCTTTAA  AAGGGGACTA  ACACACTGAA  AGAGTAACTT
rn20637/Phex          421  GAACTCTTAG  AAGACTTTAA  AAGGGGACTA  ACACACTGAA  AGAGTAACTT

hs29804/PHEX          485  TTGATGAAGA  CAATTCAGGC  AAGCAGAATG  ATTCTtgcaa  CAGAATTACA
mm90141/Phex          472  TTGACGACGA  CAGTTCAGAC  AAGGAGAATG  gCTGTcATAG  CAGAATCTG
rn20637/Phex          471  TTGACGATGA  CAGTTCAGAC  AAGGAGAATG  ACTCTCATAG  CAGAATCTG

```

hs29804/PHEX	535	TGATTAATTG	AGATCTTGAA	GTGGGTCCGG	tgaatCCTGG	CCACCTAACT
mm90141/Phex	522	TAACTAATTG	AGATCTTGAA	TTGGATGCAG	ACTGTCCTTG	CCACCTAACT
rn20637/Phex	521	TAACTAGTTG	GGATCCTGAA	GTGGATGCGG	ACTGTCCTTG	CCACCTAACT
hs29804/PHEX	585	TATCATGATT	TGGGGGAGTT	TcacGAGAA	CCAGTTTGA	TAAAAcaatt
mm90141/Phex	572	TATCATGGTT	AGGGGGAGGG	T---GGGAA	CCACTTTTGA	TAAAAgacaa
rn20637/Phex	571	TATCATGCTT	AGGGGGAGGT	T---GAGAA	CCACTTGTGA	TAAAgaca--
hs29804/PHEX	635	g-TTTTTTTC	CTCCCCAAGT	GACTATACAT	TTAAATAGCT	AAAACATCTG
mm90141/Phex	619	atTTTTTTTC	CTCCCCAAGT	GACTATACGT	TTAAATAGCT	AAAACATCTG
rn20637/Phex	616	--TTTTTTTC	CTCCCCAAGT	GACTATACGT	TTAAATtGCT	AAAACATCTG
hs29804/PHEX	684	TTCAGCAACA	TAGTAAAACA	TATATACTCG	GAAcGCTTGA	GAGAAGAGCC
mm90141/Phex	669	TGCAGCAACC	TAGTAAAACA	TGTATACTCG	GAATGCTTGA	GCAAAAAACC
rn20637/Phex	664	TGCAGCAACC	TAGTAAAACA	T-TATAATCG	GAATGCTTGA	GCAAAAAACC
hs29804/PHEX	734	TGCCAAAC--	-----A	GGGACTTTGC	TGAGGGAGAG	CACCAAGATA
mm90141/Phex	719	TGCCAAACAA	TtGCTTGAGA	GGGACTTTGC	TGAGGGAGAG	CACCAAGATA
rn20637/Phex	713	TGCCAAACAA	TcGCTTGAGA	GGAACTTTGC	TGAGGGAGAG	CACCGAGATA
hs29804/PHEX	773	AAGCAACa-C	TGTTTGTFFF	GTCTAGTCAg	ggggaaAGCC	AAGGCAACCA
mm90141/Phex	769	AAGCAACTGC	TGTTTGTFFF	GTCTAGTCAA	aggcG-AGCC	AAGGCAACCA
rn20637/Phex	763	AAGCAACTGC	TGTTTGTFFF	GTCTAGTCAA	gagaG-AGCC	AAGGCAACCA
hs29804/PHEX	822	ATATTTTGgt	ttttataatT	TTCATTTGTG	AAGAATTATT	TGAGAAAGGG
mm90141/Phex	818	ATATTTTGAG	TTTCTTTTAT	TTCATTTGTG	AAGGATTATT	TGAGAAAGGG
rn20637/Phex	812	ATATTTTGTG	TTTCTTTTAT	TTCATTTGTG	AAGGATTATT	TGAGAAAGTG
hs29804/PHEX	872	TGgCGAGGGG	AGATTTCCCTG	ACGGCAGTTT	CTTAAAGCTGT	CcATTAGTAG
mm90141/Phex	868	TGTCGAGGGG	AAGTTTCCCTG	ACAGGAATTT	TTAAAGCTGT	CTATTAGCAG
rn20637/Phex	862	TGTCGAGGGG	AAGTTTCCCTG	ACAGGAATTT	TTAAAGCTGT	CTATTAGCAG
hs29804/PHEX	922	AAGAGCAAGA	AAGCCTTGGA	TGTCAAcgcc	tcg-----CT	CTTGAGACCA
mm90141/Phex	918	ACGAGCAAGA	GAGTCTTGAA	TATCAAACGC	CTGACAAACT	tTTGAGACCA
rn20637/Phex	912	ACGAGCAAGA	GAGTCTTGAA	TGTCAAATGC	CTGACAAACT	CTTGAGACCA
hs29804/PHEX	967	GCCACCAAAC	CACGAAAAGT	GACTTTCTtc	tcgtgtgcTC	TCTACGGCCC
mm90141/Phex	968	GCCACCAAAC	CACGAAAAGT	GACTTTCctt	ctaAGTCTTC	TCTCCAGCCC
rn20637/Phex	962	GCCACCAAAC	CACGAAAAGT	GACTTTCTg-	---AGTCTTC	TCTTCGGCCC
hs29804/PHEX	1017	TTCTGATGGA	AGCAGAAACA	GGGAGCagcg	-	
mm90141/Phex	1018	TTCTGATGGA	AGCAGAAACA	GGGAGCA---	-	
rn20637/Phex	1008	TTCTGATGGA	AGCAGAAACA	GGGAGCacca	t	

**FIGURA 8:** Resultado do alinhamento da região de 1046 bp do gene PHEX humano (hs2984) e de parte da seqüência do gene PHEX de rato (rn20637) com o promotor murino (mm90141) utilizando o programa DiAlign.

**TABELA 4: Identidade entre a região de 1046 bp do gene PHEX humano (hs2984), a seqüência do gene PHEX de rato (rn20637) e o promotor de PHEX murino (mm90141) obtida com o programa DiAlign.**

	mm90141/Phex (1044 bp)	rn20637/Phex (1038 bp)
hs29804/PHEX (1046 bp)	73 %	75 %
mm90141/Phex (1044 bp)		<u>89 %</u>

**Identidade – Porcentagem de nucleotídeos idênticos.**

Com o programa ModelInspector professional Release 4.8.2 foram identificados possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição a seqüência de 1046 bp, confirmando os dados encontrados no fragmento de 4498 bp com o programa Eldorado. Na **TABELA 5** encontram-se informações dos sítios de ligação desses fatores de transcrição. Apenas os sítios de ligação com as maiores porcentagens de similaridade do modelo foram listados, ou seja, aqueles que possuem as maiores porcentagens dos elementos necessários para a ligação do fator de transcrição.

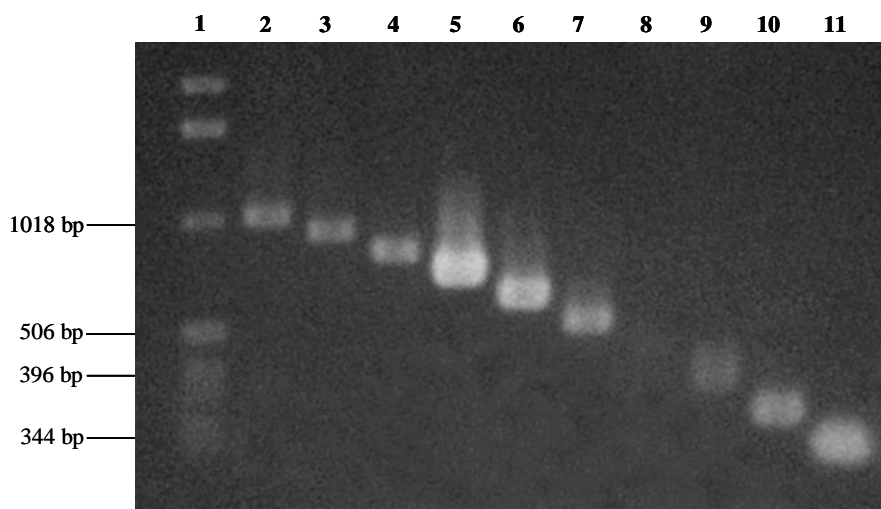
**TABELA 5: Prováveis sítios de ligação de fatores de transcrição na seqüência de 1046 bp, de acordo com o programa ModelInspector.**

Fator de transcrição	Posição	Fita	Seqüência	Similaridade do modelo
SMADA	120 - 128	(-)	GTCTGCCAC	86,7%
EBOX	602 - 616	(+)	GTTTCACGAGAATCC	87,2%
CEBP	172 - 186	(-)	GATATGATGAAAAAT	93,6%
NFAT	162 - 172	(+)	CAAGGAAAAAA	97,5%
HOXF	523 - 539	(+)	AACAGAATTACATGATT	87%
HOXF	532 - 548	(+)	ACATGATTAATTGAGAT	94,8%
EGRF	590 - 604	(+)	TGATTTGGGGGAGTT	71%
SP1F	594 - 608	(+)	TTGGGGGAGTTTCAC	94,3%
TTF	644 - 658	(+)	CTCCCAAGTACTA	86%
FKHD	629 - 645	(-)	AGGAAAAAACAATTGT	97,8%
NKXH	646 - 658	(+)	CCCAAGTACTA	93,2%
NKXH	657 - 669	(-)	ATTAAATGTATA	79,6%
GATA	765 - 777	(+)	CCAAGATAAAGCA	98,5%
TTF	713 - 727	(-)	TCTCTCAAGCGTTC	96,4%
FKHD	731 - 747	(+)	GCCTGCCAACAGGGAC	79%
PAX8	714 - 726	(-)	CTCTCAAGCGTTC	98,3%
TTF	713 - 727	(-)	TCTCTCAAGCGTTC	96,4%
CEBP	857 - 871	(+)	TTATTTGAGAAAGGG	92,6%
EGRF	872 - 886	(+)	TGGCGAGGGGAGATT	71,2%
CEBP	896 - 910	(-)	CAGCTTAAGAACTG	92,7%
<i>STAT</i>	910 - 928	(-)	TGCTCTTCTACTAATGGAC	83%



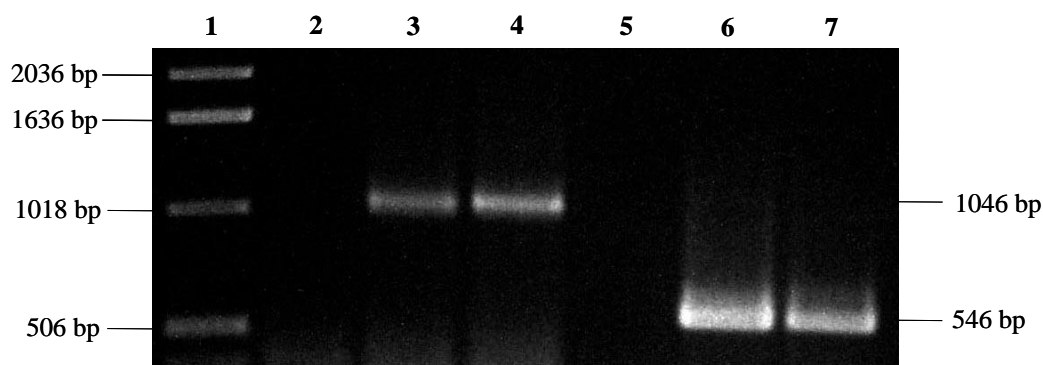
## 2. AMPLIFICAÇÃO DE DIFERENTES FRAGMENTOS DA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA DO GENE PHEX

Utilizando-se oligonucleotídeos específicos foi possível amplificar a região de 1046 nucleotídeos, e fragmentos sucessivamente menores desta região, que continham sempre 100 pares de bases a menos que o fragmento anterior. Diferentes concentrações de  $MgCl_2$  e temperaturas de pareamento de oligonucleotídeos foram testadas (Dados não Mostrados) até que as condições de ensaio foram estabelecidas, e encontram-se descritas no item 3 (Material e Métodos). Os resultados obtidos com essas condições encontram-se na **FIGURA 9**, na qual é possível observar a especificidade e o rendimento das reações.



**FIGURA 9: Amplificação de diferentes fragmentos da provável região promotora do gene PHEX.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 – fragmento de 1046 bp; linha 3 – fragmento de 946 bp; linha 4 - fragmento de 846 bp; linha 5 – fragmento de 746 bp; linha 6 – fragmento de 646 bp; linha 7 – fragmento de 546 bp; linha 8 – fragmento de 446 bp; linha 9 – fragmento de 346 bp; linha 10 – fragmento de 246 bp; linha 11 – fragmento de 146 bp.

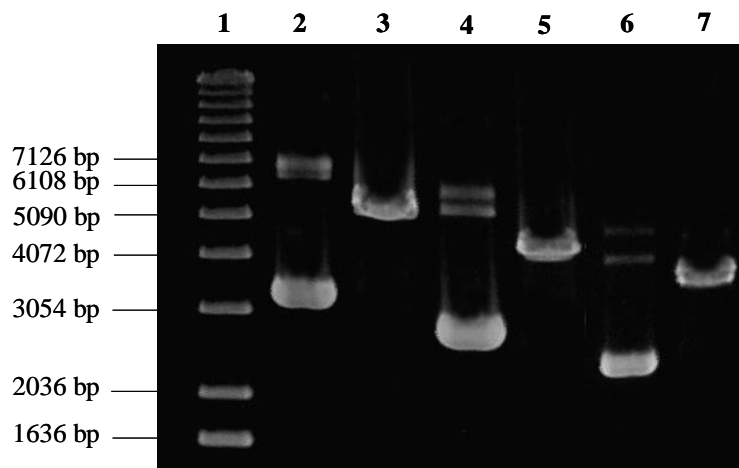
O fragmento de 1046 nucleotídeos e a região contendo 500 pares de bases a menos do que ele (fragmento -500), também foram amplificados com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *XhoI* ou *HindIII*. O resultado obtido nesta amplificação pode ser visualizado na **FIGURA 10**.



**FIGURA 10: Amplificação do fragmento de 1046 nucleotídeos e a do fragmento -500 com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 – controle negativo da reação com o oligonucleotídeo 1046 (*XhoI*); linha 3 e 4 – fragmento de 1046 bp amplificado com dois DNAs molde diferentes; linha 5 – controle negativo da reação com o oligonucleotídeo -500 (*XhoI*); linha 6 e 7 – fragmento -500 amplificado com dois DNAs molde diferentes.

### 3. DIGESTÃO PARA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS VETORES

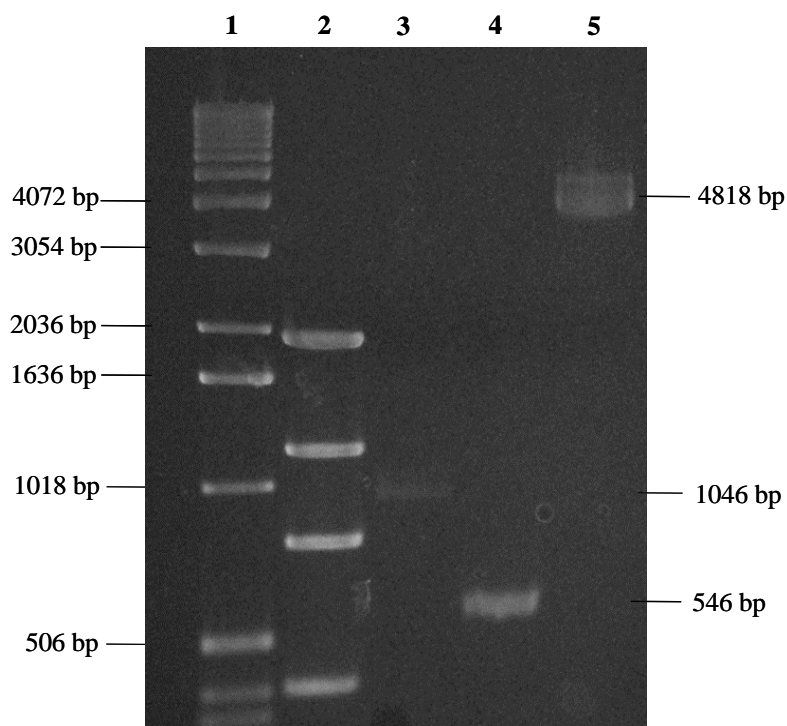
Os plasmídeos pGL3-Basic, pGL3-Control e pRL-TK foram transformados nas células JM109 por eletroporação para sua perpetuação em nosso laboratório conforme descrito no item 9 (Material e Métodos). Após miniprep das colônias transformadas a confirmação da identidade dos plasmídeos obtidos foi feita através da digestão dos plasmídeos pGL3-Basic e pGL3-Control com a enzima *SmaI* e do plasmídeo pRL-TK com a enzima *EcoRI*. Na **FIGURA 11** pode-se confirmar o tamanho de cada plasmídeo.



**FIGURA 11: Confirmação do tamanho dos vetores obtidos após miniprep.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Experimento de digestão utilizando-se as enzimas *SmaI* e *EcoRI* para os vetores pGl-3 e pRL-TK, respectivamente. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 - vetor pGL3-Control (5256 bp) não digerido; linha 3 - vetor pGL3-Control digerido; linha 4 - vetor pGL3-Basic (4814 bp) não digerido; linha 5 - vetor pGL3-Basic digerido; linha 6 - vetor pRL-TK (3785 bp) não digerido; linha 7 - vetor pRL-TK digerido.

#### **4. DIGESTÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS 1046 E -500 E DO VETOR PGL3 BASIC.**

Os produtos das reações de PCR e o vetor pGL3-Basic digeridos foram purificados do gel de agarose conforme descrito no item 6 (Material e Métodos). A análise de uma alíquota deste DNA purificado pode ser vista na **FIGURA 12**, aonde é possível mensurar a concentração de DNA obtida.

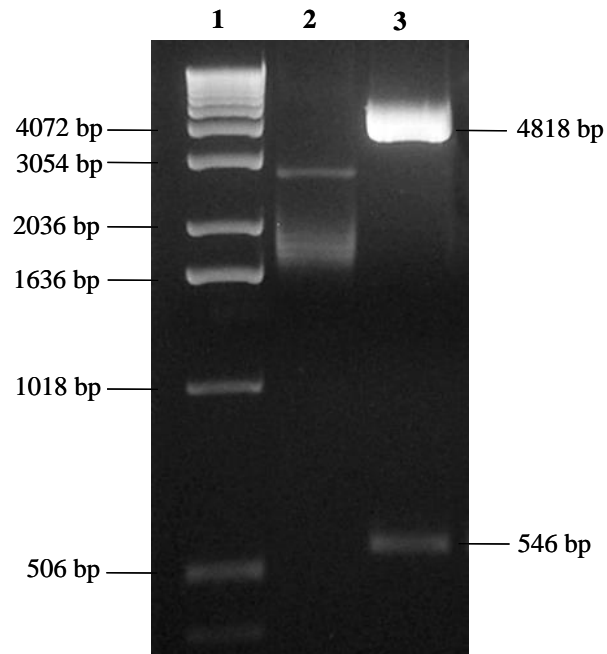


**FIGURA 12: Digestão e Purificação dos fragmentos 1046 e -500 e do vetor pGL3 Basic.**

Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Análise da digestão com as enzimas *Hind* III e *Xho* I e posterior purificação dos fragmentos de 1046 e de 546 bp e do plasmídeo pGL3 Basic. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 - “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen); linha 3 – fragmento de 1046 bp; linha 4 – fragmento de 546 bp; linha 5 – vetor pGL3-Basic.

## 5. CLONAGEM DO FRAGMENTO -500

O fragmento -500 e o vetor pGL3-Basic digeridos e purificados foram utilizados em uma reação de ligase (item 7 – Material e Métodos) e, posteriormente transformados nas células JM109 por eletroporação. Após a miniprep do vetor recombinante, o mesmo foi digerido com as enzimas *Xho* I e *Hind* III para a confirmação do sucesso da reação de ligase. Na **FIGURA 13** pode-se visualizar a liberação do inserto de 546 pares de bases.



**FIGURA 13: Confirmação da clonagem do fragmento - 500.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Análise da digestão do plasmídeo pGL3 Basic com o inserto -500 com as enzimas *Hind* III e *Xho* I. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 – vetor pGL3-Basic recombinante não digerido; linha 3 – vetor pGL3-Basic recombinante digerido.

## 6. SEQÜENCIAMENTO DO CLONE - 500

O clone -500 (vetor pGL3-Basic com o fragmento -500) foi seqüenciado através do programa PDTIS/FIOCRUZ. Na **FIGURA 14** encontra-se o alinhamento da seqüência obtida por seqüenciamento utilizando o oligonucleotídeo GL2 (Query) com o provável promotor do gene PHEX (fragmento de 1046 bp - Sbjct). Nesta figura é possível observar que o fragmento desejado foi clonado com sucesso.

---

Score = 1019 bits (530), Expect = 0.0

Identities = 539/547 (98%)

Strand = Plus / Minus

Query: 28 cgctgctccctgtttctgcttccatcagaagggccgtagagagcacacgagaagaaagtc 87  
|  
Sbjct: 1046 cgctgctccctgtttctgcttccatcagaagggccgtagagagcacacgagaagaaagtc 987

Query: 88 acttttcgtggtttggtggctggtctcaagagcgaggcggttgacatccaaggctctcttg 147  
|  
Sbjct: 986 acttttcgtggtttggtggctggtctcaagagcgaggcggttgacatccaaggctctcttg 927

Query: 148 ctcttctactaatggacagcttaagaaactgccgtcaggaaatctcccctcgccaccctt 207  
|  
Sbjct: 926 ctcttctactaatggacagcttaagaaactgccgtcaggaaatctcccctcgccaccctt 867

Query: 208 tctcaaataattcttcacaaatgaaaattataaaaacccaaaatattggttgcttggctt 267  
|  
Sbjct: 866 tctcaaataattcttcacaaatgaaaattataaaaacccaaaatattggttgcttggctt 807

Query: 268 tccccctgactagacaaaacaaacagtggtgctttatcttggtgctctccctcagcaaag 327  
|  
Sbjct: 806 tccccctgactagacaaaacaaacagtggtgctttatcttggtgctctccctcagcaaag 747

Query: 328 tccctgtttggcaggctcttctctcaagcgttccgagtatatatgttttactatgttgct 387  
|  
Sbjct: 746 tccctgtttggcaggctcttctctcaagcgttccgagtatatatgttttactatgttgct 687

Query: 388 gaacagatgtttagctatttaaagtatagtcacttggggagggnnnnnncaattgttt 447  
|  
Sbjct: 686 gaacagatgtttagctatttaaagtatagtcacttggggagggaaaaaacaattgttt 627

```

Query: 448  tatcaaaactggattctcgtgaaactccccaaatcatgataagttaggtggccaggatt 507
           |
           |
           |
Sbjct: 626  tatcaaaactggattctcgtgaaactccccaaatcatgataagttaggtggccaggatt 567

Query: 508  caccggaccacttcaagatctcaattaatcatgtaattctggtgcaagaatcattctgc 567
           |
           |
           |
Sbjct: 566  caccggaccacttcaagatctcaattaatcatgtaattctggtgcaagaatcattctgc 507

Query: 568  ttgcctg 574
           |
           |
           |
Sbjct: 506  ttgcctg 500

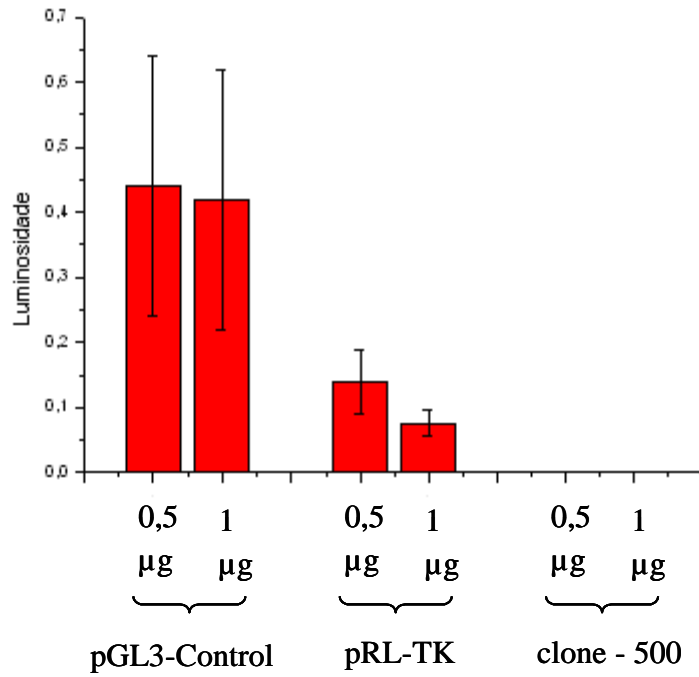
```

**FIGURA 14: Resultado do alinhamento da seqüência obtida por seqüenciamento utilizando o oligonucleotídeo GL2 (Query) com o provável promotor do gene PHEX (fragmento de 1046 bp - Sbjct).**

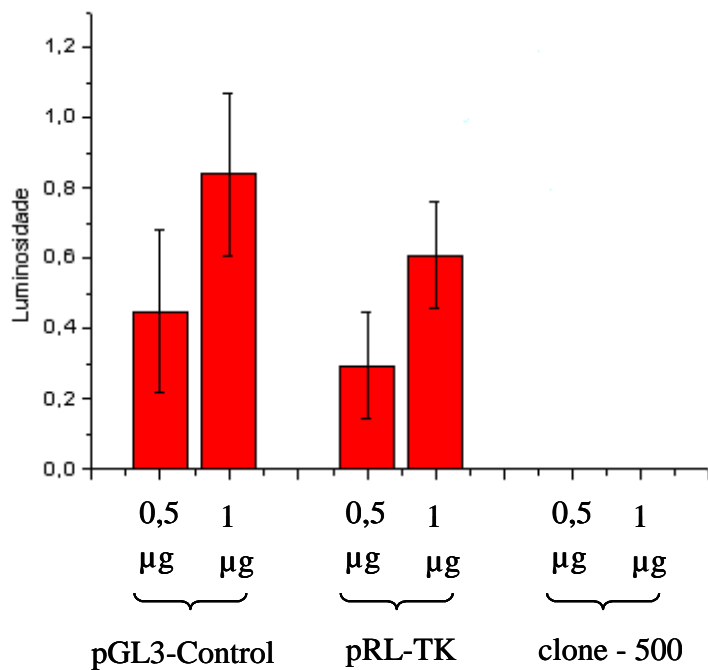
---

## 7. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE

As células de Schwann e os osteoblastos foram transfectados com o clone -500 (vetor pGL3-Basic com o fragmento -500) e com os vetores pGL3-Control e pRL-TK. Primeiramente, cada plasmídeo foi transfectado separadamente, e testou-se diferentes concentrações dos mesmos (0,5 e 1 µg). Após lise celular as luminosidades geradas pelas luciferasas de vaga-lume e de Renilla foram medidas em luminômetro. A média da luminosidade obtida de triplicatas transfectadas com cada concentração dos vetores pGL3-Control e pRL-TK e com o clone -500 pode ser visualizada na **FIGURA 15** (células de Schwann) e na **FIGURA 16** (osteoblastos). Nestas figuras podemos observar que as células transfectadas com o clone -500 não apresentaram luminosidade.



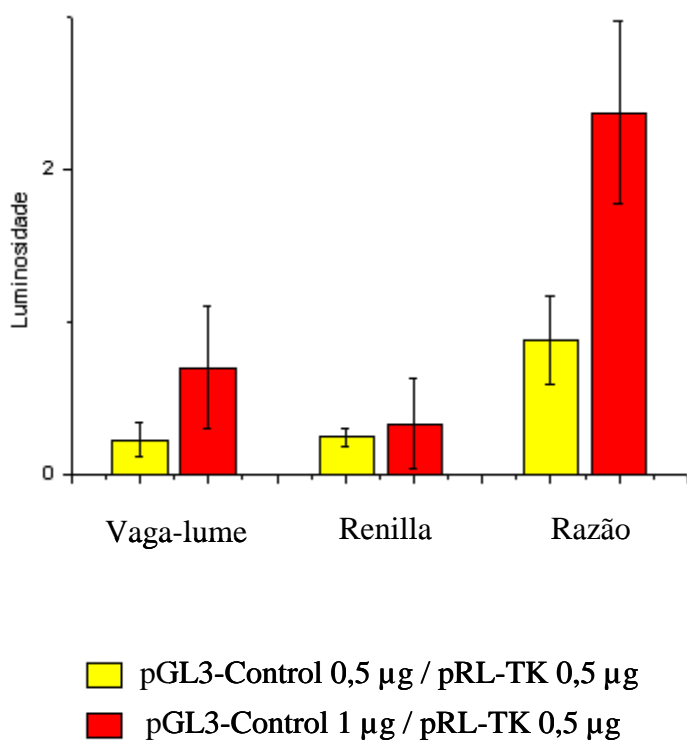
**FIGURA 15:** Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control, pRL-TK e pelo clone -500 em células de Schwann ST88-14.



**FIGURA 16:** Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control, pRL-TK e pelo clone -500 em cultura primária de osteoblastos.



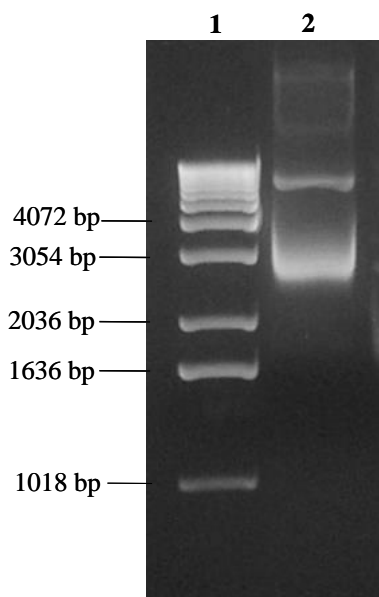
Posteriormente, os plasmídeos foram cotransfectados em células de Schwann, novamente testando-se diferentes concentrações de DNA. A cotransfecção do clone -500 com o vetor pRL-TK apresentou luminosidade apenas da luciferases de Renilla (Dados não mostrados). A média da luminosidade gerada pela triplicata cotransfectada com os vetores pGL3-Control e pRL-TK pode ser visualizada na **FIGURA 17**, aonde está demonstrado a média da luminosidade das luciferases de vaga-lume (pGL3-Control) e de Renilla (pRL-TK) separadamente, assim como a razão entre as luminosidades de vaga-lume e de Renilla.



**FIGURA 17:** Luminosidade gerada pelos plasmídeos pGL3-Control e pRL-TK cotransfectados em células de Schwann ST88-14 e razão das luminosidades de vaga-lume /Renilla.

## 8. CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO 1046

Apesar das inúmeras tentativas, não conseguiu-se clonar o fragmento 1046 no vetor de interesse. Em uma das tentativas de clonagem deste fragmento, após miniprep das bactérias eletroporadas o vetor obtido não era digerido após o tratamento com as enzimas *Hind* III e *Xho* I. O resultado desta digestão encontra-se na **FIGURA 18**.



**FIGURA 18: Tentativa de clonagem do fragmento 1046.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Análise da digestão com as enzimas *Hind* III e *Xho* I do plasmídeo pGL3 Basic após reação de ligase com o fragmento de 1046 bp. Linha 1 - Marcador de peso molecular (1 kb Ladder - Invitrogen); linha 2 – vetor pGL3-Basic recombinante digerido.

O seqüenciamento deste vetor recombinante utilizando o oligonucleotídeo -500 gerou uma seqüência que pode ser alinhada ao gene PHEX, entretanto o seqüenciamento com o oligonucleotídeo 1046 não gerou nenhuma seqüência, e com o oligonucleotídeo GL2 gerou uma seqüência que só se anela a região 3' do provável promotor do gene PHEX (fragmento de 1046 bp). Esses dados demonstram que o fragmento clonado no vetor pGL3-Basic estava truncado. Por isso, as tentativas de clonagem do fragmento 1046 continuam em andamento em nosso laboratório.

## **V. DISCUSSÃO**

Um aspecto muito importante sobre a hanseníase é que além das lesões dos nervos periféricos os pacientes também apresentam alterações na estrutura óssea, que contribuem para agravar as deformidades características da doença. As pesquisas sobre a interação entre o *M. leprae* e as células humanas hospedeiras realizadas em nosso laboratório revelaram que o *M. leprae* regula negativamente a expressão do gene PHEX. Este gene codifica para uma endopeptidase de membrana plasmática relacionada ao metabolismo de fosfato que participa do processo de mineralização da matriz óssea. Essa modulação da expressão do gene PHEX pelo *M. leprae* aponta a proteína PHEX como um possível agente molecular nas osteopatias hansenianas.

O gene PHEX foi primeiramente identificado como sendo o responsável pela osteomalácia hipofosfática ligada ao cromossomo X (XLH). Todas as mutações deste gene encontradas até hoje em pacientes com XLH estão localizadas na região codificante do gene e resultam na perda de atividade da proteína PHEX. Este fato fez com que as pesquisas relacionadas ao gene PHEX se concentrassem no estudo da seqüência codificante deste gene, e que nenhuma atenção fosse dada a regulação da transcrição do mesmo. Assim, apesar da importância de PHEX o promotor deste gene humano ainda não foi caracterizado experimentalmente.

Os estudos na regulação da expressão do gene PHEX, incluindo a caracterização da região promotora, se fazem necessários para a determinação dos mecanismos utilizados pelo *M. leprae* para a inibição da expressão de PHEX. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a região promotora do gene PHEX humano. Para isso decidiu-se identificar o provável promotor pela utilização de ferramentas de bioinformática disponíveis na internet e validar estas informações através da análise desta região do DNA genômico com a metodologia de “gene reporter”.

Assim, uma seqüência de 4498 bp localizada à frente do início da fase de leitura aberta do gene PHEX humano, adquirido no site NCBI, foi analisada através do programa Genomatrix Eldorado 3.0.2. O Eldorado é uma ferramenta de busca por genomas que disponibiliza a localização de elementos funcionais da seqüência analisada. Este programa integra informações das anotações do genoma de acesso público com elementos preditos pelo Genomatrix através de métodos *in silico*. O “Promoter Inspector” é um exemplo destes métodos *in silico*, que utiliza um algoritmo baseado em genômica comparativa para prever regiões promotoras.

O programa Eldorado identificou na seqüência de 4498 bp uma seqüência de 1031 bp anotada como sendo o promotor do gene PHEX humano. Entretanto o algoritmo do “Promoter Inspector” não foi capaz de prever uma seqüência promotora no mesmo fragmento.

O alinhamento do já caracterizado promotor murino com uma região do gene PHEX humano um pouco maior do que a região promotora encontrada pelo programa Eldorado, contendo 1046 bp, identificou uma identidade de 73% entre estas duas seqüências. Com este resultado elegemos esta região como sendo o provável promotor do gene PHEX, a despeito do resultado obtido pelo programa “Promoter Inspector”, por considerarmos os dados de homologia mais confiáveis, já que os resultados *in silico* podem variar de acordo com o algoritmo utilizado.

O fragmento de 1046 bp foi, então, analisado pelo programa Model Inspector professional Release 4.8.2 (GENOMATIX). Esta análise confirmou os possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição já identificados na seqüência de 4498 bp. O programa foi capaz de reconhecer um grande número de sítios de ligação na seqüência analisada, entretanto é importante distinguir um sítio de ligação real de uma seqüência aleatória. Para resolver este problema, o programa calcula a similaridade do modelo, que é a porcentagem dos elementos necessários para a ligação do fator de transcrição que estão presentes na seqüência analisada. Uma similaridade de 100% significa que todos os elementos necessários foram encontrados. Entretanto, similaridades a partir de 80% já são consideradas como um bom resultado. Alterações de bases em posições altamente conservadas do sítio de ligação diminuem a similaridade mais do que alterações em regiões menos conservadas. Assim, apenas os sítios de ligação com as maiores porcentagens de similaridade do modelo foram considerados.

Dentre os fatores de transcrição identificados alguns são citados na literatura como associados às proteínas morfogênicas do osso (BMPs). As BMPs induzem a formação óssea e cartilaginosa, além de terem um papel importante no desenvolvimento cardíaco e neural. Os fatores SMADA exercem um papel central na transdução de sinal das BMP. Os SMADA são fosforilados pelos receptores de BMP sendo, posteriormente, translocados para o núcleo da célula aonde participam da transcrição gênica juntamente com outros fatores de transcrição (Chen *et al.*, 2004). Os fatores de ligação EBOX inibem a expressão das BMPs. A ativação de SMADA e/ou EBOX e todos os mecanismos que regulam estas ativações fazem com que a indução da formação óssea seja um evento espacial e temporalmente regulado, ocorrendo apenas quando e onde as BMP estão presentes (Ebara e Nakayama, 2002).

Os CEBPs, juntamente com outros fatores de transcrição, são importantes reguladores da expressão de fatores de crescimento e seus receptores. Dentre estes fatores de

crescimento estão as BMPs. Provavelmente, os eventos que ligam estes fatores de crescimento aos fatores de transcrição ocorrem em resposta a glicocorticóides, esteróides sexuais, PTH ou prostaglandinas que sabidamente possuem efeitos sobre o metabolismo ósseo (McCarthy *et al.*, 2000).

As BMPs induzem a diferenciação dos cardiomiócitos através do fator de transcrição GATA, que é um importante fator para o desenvolvimento cardíaco (Monzen *et al.*, 2002). Além disso, os sinais gerados nas células pelas BMPs podem levar a ativação de STATs no sistema nervoso (Hall e Miller, 2004). STATs também participam da transdução de sinais das BMPs para a proliferação celular durante o desenvolvimento das cartilagens (Shum e Nuckolls, 2002).

O papel das BMPs nos ossos, cartilagens e no sistema nervoso, a expressão de PHEX nestes tecidos e a importância dos mesmos fatores de transcrição na expressão de PHEX e na regulação da atividade das BMPs sugerem que a regulação destas duas proteínas podem ser interligadas. Entretanto, nenhum dado foi encontrado na literatura a este respeito.

Outro fator de transcrição identificado no fragmento de 1046 bp e que também está envolvido no desenvolvimento celular é o NFAT. Esta família de proteínas cuja ativação é controlada por uma fosfatase cálcio dependente (Martinez-Martinez e Redondo, 2004), participa do desenvolvimento principalmente do sistema cardiovascular e dos músculos esqueléticos (Schulz e Yutzey, 2004), aonde PHEX também é expresso.

Além dos sítios de ligação de fatores de transcrição outro elemento funcional identificado através da análise da seqüência de 4498 bp pelo programa Eldorado foi uma região de ancoramento às proteínas de matriz nuclear (SMAR). As SMARs formam uma das poucas classes de DNA não codificante de eucariotos que tiveram sua função caracterizada experimentalmente. Essas seqüências de DNA estão envolvidas no ancoramento da cromatina a estruturas de suporte tradicionalmente chamadas de matriz nuclear (Glazko *et al.*, 2003). As SMARs funcionam como origem de replicação, além de estarem associadas a segmentos de DNA ricos em sítios de ligação a fatores de transcrição, o que provavelmente facilita a transcrição de genes associados a estas regiões (Krawetz *et al.*, 2005).

O envolvimento das SMARs na regulação da transcrição e a presença deste elemento funcional na seqüência de 4498 bp, fora do provável promotor, sugerem que outras seqüências além do promotor possam estar envolvidas na regulação da expressão do gene PHEX. Sendo assim, futuramente, pretende-se analisar 4448 nucleotídeos deste fragmento através da metodologia de “gene reporter” e por ensaios de “DNase I Footprinting”. Os oligonucleotídeos necessários para a amplificação deste fragmento já encontram-se em nosso laboratório.

Após a determinação da região de 1046 bp como sendo o provável promotor do gene PHEX humano partiu-se para a confirmação deste dado *in vivo*. Para isso, primeiramente, amplificou-se esta região e fragmentos menores da mesma através da técnica de PCR.

O rendimento e a especificidade de uma reação de PCR requer alta taxa de amplificação da região de interesse e a não amplificação de regiões indesejadas. Vários parâmetros, tais como as concentrações dos reagentes e o programa de temperaturas utilizado podem interferir na qualidade da reação e precisam ser otimizados (Sambrook e Russell, 2001). Assim, a temperatura de pareamento ao DNA molde e as concentrações de MgCl<sub>2</sub> foram determinadas, para cada par de oligonucleotídeos, após a avaliação de uma faixa de valores para cada uma das variáveis. Após essa etapa de otimização obteve-se um bom rendimento e uma alta especificidade na amplificação de todos os fragmentos. Com isso, partiu-se para a clonagem dos fragmentos no vetor de interesse. Entretanto, após inúmeros testes não obtivemos sucesso em clonar esses fragmentos.

Sabe-se que um melhor rendimento geralmente é obtido ao se clonar fragmentos com extremidades coesivas do que fragmentos com terminal cego, como os que estavam sendo utilizados. Portanto, para facilitar o processo de clonagem, novos oligonucleotídeos contendo sítios de restrição foram desenhados. A digestão dos fragmentos amplificados com estes novos oligonucleotídeos e do vetor de interesse, com as mesmas enzimas de restrição, gera extremidades coesivas que não só aumentam as probabilidades da clonagem ocorrer, como também promovem uma clonagem orientada por impedir que a seqüência se ligue de forma invertida no vetor.

Utilizando-se este princípio foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos fragmentos 1046 e -500. Esta estratégia foi tomada para que de acordo com os resultados obtidos com a análise destes dois fragmentos pela metodologia de “gene reporter” fosse, então, decidido se seria preciso utilizar fragmentos maiores ou menores do que estes, para a determinação da porção mínima do promotor do gene PHEX humano.

Após a amplificação, digestão e purificação destes dois fragmentos e do vetor pGL3-Basic deu-se início a novas reações de clonagem e conseguiu-se clonar o fragmento -500. Infelizmente o fragmento 1046 não foi clonado, mas os procedimentos para que esta clonagem ocorra continuam em andamento em nosso laboratório.

A clonagem de um fragmento truncado na região 5' em uma das tentativas de se clonar o fragmento 1046 sugeriu que o oligonucleotídeo senso utilizado para a amplificação deste fragmento poderia estar apresentado algum problema, seja este algum nível de degradação, um alinhamento inespecífico ou uma degradação gerada pela enzima de restrição utilizada para a digestão deste fragmento. Por acreditar que este poderia ser o problema que

estava impedindo a clonagem do fragmento 1046 decidiu-se desenhar um novo oligonucleotídeo senso para a amplificação desta região. Infelizmente, estamos aguardando a chegada deste oligonucleotídeo em nosso laboratório para que possamos começar os procedimentos necessários para a clonagem deste fragmento.

Enquanto as tentativas de clonagem do fragmento 1046 continuavam, prosseguiu-se com os experimentos com o clone -500 (vetor pGL3-Basic com o fragmento -500). O clone -500 foi seqüenciado através do programa PDTIS/FIOCRUZ o que confirmou que o fragmento clonado era realmente a porção do promotor do gene PHEX desejada. Assim, partiu-se para os experimentos de “gene reporter”. Nesta metodologia determina-se se o fragmento -500 que está clonado à frente da região codificante de um outro gene é capaz de induzir a expressão do mesmo. Neste trabalho foi utilizado o gene da luciferase. Esta enzima encontrada em vagalumes, quando em contato com seu substrato luciferina provoca luminescência. Em virtude desta propriedade pode-se mensurar a concentração de enzima pela intensidade de luminescência e assim comparar o grau de indução de expressão da luciferase gerada por diferentes seqüências regulatórias.

Então, para a realização desta metodologia, primeiramente, é preciso transfectar o vetor recombinante e os vetores controles nas células eucarióticas de interesse. A metodologia escolhida para a transfecção das células neste trabalho foi o Tfx™ Reagent (PROMEGA). O componente lipídico do Tfx™ Reagent é positivamente carregado, assim quando colocado juntamente com as cargas negativas dos ácidos nucléicos, resulta na formação de uma vesícula multilamelar. Essas vesículas presumivelmente facilitam a transferência dos ácidos nucléicos para as células pela interação com os lipídeos da membrana celular. Como a superfície das células é negativamente carregada é importante que as vesículas possuam um excesso de cargas positivas. Assim, segundo o fabricante, uma proporção de cargas de 2:1 a 4:1 (Tfx:DNA) geralmente funciona bem em culturas de células. Neste trabalho foi utilizada a proporção 2:1.

Os dois tipos celulares escolhidos para este trabalho foram osteoblastos e células de Schwann. Os osteoblastos são as principais células que expressam PHEX, assim espera-se que o promotor do gene PHEX induza uma maior expressão de luciferase em osteoblastos do que em qualquer outro tipo celular. A célula de Schwann é a principal hospedeira do *M. leprae*, logo é uma célula muito importante para a realização de ensaios futuros de inibição deste sistema de “gene reporter” pelo *M. leprae*. A utilização destes dois tipos celulares também é importante para se determinar se eles utilizam diferentes mecanismos para a regulação da expressão do gene PHEX.

Assim as culturas de células utilizadas foram a linhagem de células de Schwann ST88-14 e culturas primárias de osteoblastos humanos. Apesar de serem isoladas de um tumor maligno nos nervos periféricos as células ST88-14 apresentam similaridades com culturas primárias de células de Schwann, mas ao contrário das culturas primárias, são células de fácil cultivo. As culturas primárias de osteoblastos também demonstraram serem células de fácil cultivo e crescimento rápido.

Essas células foram, então, transfectadas com diferentes concentrações de DNA (0,5 e 1 µg) devido à recomendação do fabricante do Tfx™ Reagent para que diferentes concentrações de DNA sejam testadas para cada tipo celular utilizado, uma vez que a quantidade de cargas negativas presentes nas vesículas formadas por este reagente com o DNA pode interferir na eficiência da transfecção.

As culturas primárias de osteoblastos apresentaram uma maior luminosidade ao serem transfectadas com 1 µg do vetor pGL3-Control ou do vetor pRL-TK, quando comparado com a luminosidade gerada pela utilização de 0,5 µg do mesmo vetor, demonstrando que para os osteoblastos uma maior eficiência na transfecção ocorre com a utilização de 1 µg de DNA.

As células de Schwann ST88-14, por sua vez, apresentaram uma maior luminosidade quando transfectadas com 0,5 µg do vetor pRL-TK do que com 1 µg do mesmo vetor. Ao se transfectar estas células com o vetor pGL3-Control também obteve-se um melhor resultado com a utilização de 0,5 µg de DNA. Entretanto, para este vetor, a diferença das luminosidades obtidas pela utilização de diferentes concentrações de DNA é muito sutil. Esses dados, a princípio, sugerem que a concentração de DNA não interfere, significativamente, na eficiência da transfecção das células ST88-14, pelo menos em relação ao vetor pGL3-Control.

Entretanto, posteriormente, diferentes concentrações de DNA foram testadas para a cotransfecção das células de Schwann com o vetor pRL-TK juntamente com um dos vetores pGL3. Neste teste uma maior luminosidade tanto do vetor pGL3-Control (luciferases de vaga-lume) quanto para o vetor pRL-TK (luciferases de Renilla) foi obtida na cotransfecção com 1 µg do vetor pGL3-Control e 0,5 µg do vetor pRL-TK. Esses dados, apesar de inesperados, sugerem que, para a cotransfecção das células de Schwann uma maior eficiência ocorre com a utilização de um total de 1,5 µg de DNA.

Os valores de luminosidade obtidos com este experimento também foram utilizados para se calcular a razão das luminosidades de vaga-lume/Renilla. Essa razão é importante para uma posterior normalização de cada amostra de um experimento com a amostra contendo o vetor pGL3-Control, que deve estar presente em todas as placas analisadas. Essa normalização é feita pela divisão da razão de cada amostra pela razão da amostra com o vetor pGL3-Control. A divisão da razão da amostra com o vetor pGL3-Control por ela mesma será igual a um, e a divisão da razão de uma determinada amostra pela razão da amostra com o vetor pGL3-Control mostrará quantas vezes a expressão da luciferase foi aumentada ou diminuída em relação ao controle. Assim é possível minimizar o impacto de variáveis como temperatura e o tempo levado entre a adição do substrato e a leitura de cada placa, tornando mais confiável a comparação entre amostras de diferentes placas.

Em nenhuma das duas células utilizadas o clone -500 foi capaz de gerar luminosidade. Mostrando que a porção de 546 bp, que apresenta o maior número de prováveis sítios de ligação a fatores de transcrição previstos, não é suficiente para a indução da expressão do gene PHEX humano e que para isto elementos posicionados à frente deste fragmento sejam provavelmente necessários.



Hines e colaboradores (2000) também utilizaram a metodologia de “gene repórter”, com a quantificação da luminosidade gerada pela luciferase, para demonstrarem a atividade do promotor murino de PHEX, utilizando para isto células de osteosarcoma de rato. Eles verificaram uma maior expressão da luciferase com um constructo contendo as regiões -1061/+104 e uma expressão menor com os constructos -2866/+104, -542/+104 e -133/+104. Uma maior expressão da luciferase no constructo -1061/+104 do que no -2866/+104, sugere a presença de elementos de regulação negativa nesta última região.

Liu e colaboradores (2001), utilizando a mesma metodologia para estudar o promotor murino de PHEX em condrócitos, também verificaram um padrão bimodal de regulação de expressão da luciferase pelos constructos analisados. O constructo -946/+54 apresentou a maior expressão da luciferase, seguido pelos constructos -472/+54, -178/+54, -2736/+54, -1606/+54, -130/+54 e -22/+54, este último apresentando quase uma total extinção da expressão da luciferase.

Portanto, nos experimentos realizados com o promotor murino foi possível identificar a expressão da luciferase mesmo em constructos muito menores (-133/+104 e -22/+54) do que o nosso clone -500 que compreende a região -521/+25 do gene PHEX humano, e que neste trabalho não foi capaz de induzir a expressão da luciferase. Esses resultados sugerem que apesar da alta identidade verificada entre as seqüências do promotor murino e do provável promotor humano do gene PHEX, a porção mínima necessária para a indução da expressão de PHEX *in vivo* varia consideravelmente entre estas duas espécies.

Embora uma grande similaridade entre seqüências de DNA de espécies diferentes, como a observada entre as seqüências do promotor do gene PHEX de camundongos e a porção do provável promotor do gene PHEX humano estudada, em geral, sugira que as seqüências compartilhem a mesma função com relação ao gene em questão isto, nem sempre, ocorre. Hershko e colaboradores (2001), por exemplo, ao estudar a porção mínima do promotor humano e murino do gene SNPRP que codifica uma proteína envolvida no “splicing” de RNA descobriram que apesar da relativa similaridade entre as seqüências de humano e de rato a porção mínima do promotor varia entre estas duas espécies. Eles identificaram que a porção mínima do promotor murino do gene SNPRP contém todo o exon 1 e mais 84 bp na região 5'. Esta porção possui um elemento de 7 bp (SBE) fundamental para a atividade do promotor. O fragmento de DNA humano localizado na mesma região, apesar de possuir um elemento SBE idêntico ao de camundongo, não possui atividade promotora no sistema de “gene reporter”. Isto poderia ser explicado pelo fato de apesar de ambos os fragmentos possuírem o elemento SBE, o restante das seqüências não apresenta uma alta similaridade. Entretanto, neste sistema, o que parece fazer a diferença é o exon 1 do gene

SNPRP. O exon 1 de humano apresenta uma similaridade de aproximadamente 80% com o exon 1 de camundongo, apesar disto, eles parecem ser funcionalmente distintos. Constructos contendo o promotor humano e o exon 1 de camundongo possuem uma alta atividade promotora, enquanto que constructos contendo o promotor murino e o exon 1 de humano não tem atividade.

Os resultados obtidos por Hershko e colaboradores (2001) dão suporte aos nossos resultados que sugerem que a porção mínima necessária para a indução da expressão de PHEX *in vivo* varia consideravelmente entre humanos e camundongos.

## ***VI. PERSPECTIVAS***

Como perspectivas para a continuidade deste estudo, as seguintes etapas de investigação estão previstas:

- Clonagem do fragmento de 1046 bp e posterior análise do mesmo pela metodologia de “gene reporter” para confirmação dos dados obtidos por bioinformática que sugerem que o promotor do gene PHEX humano está presente neste fragmento.
- Amplificação, clonagem e análise por “gene reporter” do fragmento de 4448 bp para determinação do papel da SMAR (região de ancoramento as proteínas de matriz nuclear) na regulação da expressão do gene PHEX.

- Clonagem e análise por “gene reporter” dos fragmentos maiores do que o fragmento - 500 para a determinação da porção mínima do promotor necessária para a expressão do gene PHEX em células de Schwann ST88-14 e em culturas primárias de osteoblastos humanos, comparando se a porção mínima é a mesma nos dois tipos celulares.
- Determinar se existe uma porção do promotor suscetível ao controle pelo *M. leprae*, e se existe qual é o componente do *M. leprae* responsável por este controle, através da incubação de células transfectadas com diferentes construtos com a bactéria inteira, preparado de parede ou a fração citosólica de *M. leprae*.

## VII. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados algumas considerações podem ser feitas:

- Segundo a análise por bioinformática o fragmento de 1046 bp que compreende a região -1021/+25 do gene PHEX humano provavelmente contem o promotor do gene.
- A porção de 546 bp do provável promotor não é suficiente para a indução da expressão do gene PHEX humano, seja em células de Schwann ou em osteoblastos.
- A porção mínima necessária para a indução da expressão de PHEX *in vivo* varia consideravelmente entre seres humanos e camundongos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcais A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol** 2005 Feb; 17(1): 44-48.

Alos N, Ecarot B. Downregulation of osteoblast Phex expression by PTH. **Bone** 2005 Oct; 37(4): 589-598.

Araujo MG. Hanseníase no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2003 May-Jun; 36(3): 373-382.

Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B. Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. **Genomics** 2001 Jun; 74(3): 342-351.

Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS. Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. **J Clin Invest** 1997 Mar; 99(6): 1200-1209.

Blair HJ, Gormally E, Uwechue IC, Boyd Y. Mouse mutants carrying deletions that remove the genes mutated in Coffin-Lowry syndrome and lactic acidosis. **Hum Mol Genet** 1998 Mar; 7(3): 549-55.

Boileau G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide107-139 as a substrate and osteocalcin, PPi and phosphate as inhibitors. **Biochem J** 2001 May; 355: 707-713.

Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, Schiavi SC. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a phex substrate. **Biochem Biophys Res Commun** 2001 June; 284(4): 977-981.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem** 1995; 64: 29-63

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. **Lancet** 2004 Apr; 363(9416): 1209-1219.

Carpintero P, Garcia-Frasquet A, Tarradas E, Logrono C, Carrascal A, Carreto A. Bone island and leprosy. **Skeletal Radiol** 1998 Jun; 27(6): 330-33.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors** 2004 Dec; 22(4): 233-241.

Choudhuri H, Thappa DM, Kumar RH, Elangovan S. Bone changes in leprosy patients with disabilities/deformities: a clinico-radiological correlation. **Indian J Lepr** 1999 Apr-Jun; 71(2): 203- 215.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature** 2001 Feb; 409(6823): 1007-1011.

Dave S, Nori AV, Thappa DM, Siddaraju N. Leprous osteitis presenting as bone cyst and erosions. **Dermatol Online J** 2004 Jul; 10(1): 17.

David JP, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, Wagner EF. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. **J Clin Invest** 2005 Mar; 115(3): 664-672.

Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B. cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. **Genomics** 1996 Aug; 36(1): 22-28.

Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. **Spine** 2002 Aug; 27(16 Suppl 1): S10-S15.

Ecarot B, Desbarats M. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast. **Endocrinology** 1999 Mar; 140(3): 1192-1199.

Econs MJ. New insights into the pathogenesis of inherited phosphate wasting disorders. **Bone** 1999 Jul; 25(1): 131-135.

Econs MJ, Francis F. Positional cloning of the PEX gene: new insights into the pathophysiology of X-linked hypophosphatemic rickets. **Am J Physiol** 1997 Oct; 273(4 Pt 2): F489-F498.

Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH. Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1976 Dec; 73(12): 4667-4671.

Francis F, Strom TM, Hennig S, Boddlich A, Lorenz B, Brandau O, Mohnike KL, Cagnoli M, Steffens C, Klages S, Borzym K, Pohl T, Oudet C, Econs MJ, Rowe PS, Reinhardt R, Meitinger T, Lehrach H. Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. **Genome Res** 1997 Jun; 7(6): 573-585.

Gallo MEN, Sampaio E, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In: Coura JR, edit. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Glazko GV, Koonin EV, Rogozin IB, Shabalina SA. A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and mouse consists of predicted matrix attachment regions. **Trends Genet** 2003 Mar; 19(3): 119-124.

Grieff M, Mumm S, Waeltz P, Mazzarella R, Whyte MP, Thakker RV, Schlessinger D. Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. **Biochem Biophys Res Commun** 1997 Feb; 231(3): 635-639.

Grieff M, Whyte MP, Thakker RV, Mazzarella R. Sequence analysis of 139 kb in Xp22.1 containing spermine synthase and the 5' region of PEX. **Genomics** 1997 Sep; 44(2): 227-231.

Guo R, Rowe PS, Liu S, Simpson LG, Xiao ZS, Darryl Quarles LD. Inhibition of MEPE cleavage by Phex. **Biochem Biophys Res Commun** 2002 Sep; 297(1): 38-45.

Hall AK, Miller RH. Emerging roles for bone morphogenetic proteins in central nervous system glial biology. **J Neurosci Res** 2004 Apr; 76(1): 1-8.

Hanauer A, Young ID. Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. **J Med Genet** 2002; 39: 705-713.

Hershko AY, Finberg Y, Kantor B, Shemer R, Razin A. The mouse Snrpn minimal promoter and its human orthologue: activity and imprinting. **Genes Cells** 2001 Nov; 6(11): 967-975.

Hines ER, Collins JF, Ghishan FK. Molecular cloning of the murine PHEX gene promoter. **Biochim Biophys Acta** 2000 Oct; 1493(3): 333-336.

Hines ER, Collins JF, Jones MD, Serey SH, Ghishan FK. Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. **Am J Physiol Renal Physiol** 2002 Aug; 283(2): F356-F363.

Hines ER, Kolek OI, Jones MD, Serey SH, Sirjani NB, Kiela PR, Jurutka PW, Haussler MR, Collins JF, Ghishan FK. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> down-regulation of PHEX gene expression is mediated by apparent repression of a 110 kDa transfactor that binds to a polyadenine element in the promoter. **J Biol Chem** 2004 Nov; 279(45): 46406-46414.

HYP Consortium. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. **Nat Genet** 1995 Oct; 11(2): 130-136.

Ito M, Akai E, Izuka M, Segawa H, Kuwahata M, Miyamoto K. Cloning and characterization of three PHEX homologues in Drosophila. **J Bone Miner Metab** 2004; 22(1): 3-11.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1971 Jul-Sep; 39(3): 693-702.

Krawetz SA, Draghici S, Goodrich R, Liu Z, Ostermeier GC. In silico and wet-bench identification of nuclear matrix attachment regions. **Methods Mol Med** 2005; 108: 439-458.

Lipman, ML, Panda D, Bennett HPJ, Henderson JE, Shane E, Shen Y, Goltzman D, Karaplis AC. Cloning of human PEX cDNA: Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. **J Bio. Chem** 1998; 273: 13729-13737.

Liu S, Guo R, Quarles LD. Cloning and characterization of the proximal murine phex promoter. **Endocrinology** 2001; 142(9): 3987-3995.

Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. **J Biol Chem** 2003 Sep; 278(39): 37419-37426.



Lockwood DN, Kumar B. Treatment of leprosy. **BMJ** 2004 Jun; 328(7454): 1447-1448

Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bulletin of the World Health Organization** 2005 March; 83:230-235.

Marques MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. **Microbes Infect** 2000 Oct; 2(12): 1407-1417.

Martinez-Martinez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. **Curr Med Chem** 2004 Apr; 11(8): 997-1007.

Mautalen CA, Vaquero NL, Zeni SN, Mendez MA, Gonzalez DC, Bagur AC, Casco CA, Ladizesky MG. Calcium metabolism and its regulating hormones in patients with leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1994 Dec; 62(4): 580-585.

McCarthy TL, Ji C, Centrella M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000; 11(4): 409-422.

Mennen U, Howells C, Wiese AJ. Serum zinc, sodium, calcium, magnesium and potassium levels and standard diet in leprosy patients. **Indian J Lepr** 1993 Oct-Dec; 65(4): 415-421.

Meyer RA Jr, Henley CM, Meyer MH, Morgan PL, McDonald AG, Mills C, Price DK. Partial deletion of both the spermine synthase gene and the Pex gene in the X-linked hypophosphatemic, gyro (Gy) mouse. **Genomics** 1998 Mar; 48(3): 289-295.

Miao D, Bai X, Panda DK, Karaplis AC, Goltzman D, McKee MD. Cartilage abnormalities are associated with abnormal Phex expression and with altered matrix protein and MMP-9 localization in Hyp mice. **Bone** 2004 Apr; 34(4): 638-647.

Mira MT, Alcasis A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Dore C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E.

Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature** 2004 Feb; 427(6975): 636-640.

Monzen K, Nagai R, Komuro I. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. **Trends Cardiovasc Med** 2002 Aug; 12(6): 263-269.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborcht PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun** 2004 Nov; 5(7): 592-595.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 1998 Nov-Dec; 40(6): 363-370.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell** 2000 Oct; 103(3): 511-524.

Nigam P, Dayal SG, Sriwastava P, Joshi LD. Serum calcium and magnesium in leprosy. **Asian J Infect Dis** 1979 Jun; 3(2): 81-83.

Núñez-Martí JM, Bagan JV, Scully C, Penarrocha M. Leprosy: dental and periodontal status of the anterior maxilla in 76 patients. **Oral Dis** 2004 Jan; 10(1): 19-21.

Pearson JM, Ross WF. Nerve involvement in leprosy pathology, differential diagnosis and principles of management. **Lepr Rev** 1975 Sep; 46(3): 199-212.

Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MC, Sarno EN, Sampaio EP, Lopes UG. *Mycobacterium leprae* induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2005 Sep; 335(1): 20-26.

Presidência da república. **Objetivos de desenvolvimento do milênio - Relatório nacional de acompanhamento** [on-line]. Brasília: Ipea; 2004 [capturado em 4 de janeiro de 2006] Disponível em: [www.undp.org/mdg/2004BrazilianMDG-Portuguese.pdf](http://www.undp.org/mdg/2004BrazilianMDG-Portuguese.pdf)

Presidência da república, **Objetivos de desenvolvimento do milênio - Relatório nacional de acompanhamento** [on-line]. Brasília: Ipea; 2005 [capturado em 4 de janeiro de 2006] Disponível em: [www.pnud.org.br/odm/arquivos/odm\\_rna2005.pdf](http://www.pnud.org.br/odm/arquivos/odm_rna2005.pdf)

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. **Science** 1998 Dec; 282(5396): 2076-2079.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science** 2002 May; 296(5569): 927-931.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: A five group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1966; 34(3): 255-273.

Rodrigues LS. **Estudo do efeito anti-apoptótico do *Mycobacterium leprae* em células de Schwann humanas**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Dissertação em Biologia Molecular e Celular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Rowe PSN, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD, Mundy GR. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihabin. **Bone** 2004 Feb; 34(2): 303-319.

Rowe PSN, Garrett IR, Schwarz PM, Carnes DL, Lafer EM, Mundy GR, Gutierrez GE. Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). **Bone** 2005 Jan; 36(1): 33-46.

Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. **J Histochem Cytochem** 1998 Apr; 46(4): 459-468.

Sabbagh Y, Tenenhouse HS. **PHEX Locus Database: Search Engine Site** [online]. [Capturado em 09 mar. 2006] Disponível em: <http://www.phexdb.mcgill.ca>

Sambrook J, Russell DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis** 2002 Dec; 186(11): 1687-1691.

Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. **Dev Biol** 2004 Feb; 266(1): 1-16.

Shepard CC. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. **Am J Hyg** 1960 Mar; 71: 147-157.

Shih NR, Jo OD, Yanagawa N. Effects of PHEX antisense in human osteoblast cells. **J Am Soc Nephrol** 2002 Feb; 13(2): 394-399.

Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001 May; 98(11): 6500-6505.

Shum L, Nuckolls G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. **Arthritis Res** 2002; 4(2): 94-106.

Sinha SN, Gupta SC, Bishi D. Serum calcium and magnesium in different types of leprosy. **Lepr India** 1978 Jan; 50(1): 54-56.

Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff T. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunology and Cell Biology** 2000; 78: 349-355.

Strom TM, Francis F, Lorenz B, Boddich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T. Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. **Hum Mol Genet** 1997 Feb; 6(2): 165-171.

Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H, Taketani Y. Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. **J Cell Mol Med** 2004 Apr-Jun; 8(2): 191-200.

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005 Jun; 102(26): 9188-9193.

Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, Murer H. Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. **J Clin Invest** 1994 Feb; 93(2): 671-676.

Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, Gauthier C. Differential expression, abundance, and regulation of Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter genes in murine kidney. **Am J Physiol** 1998 Oct; 275(4 Pt 2): F527-F534.

Tenenhouse HS. X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. **Nephrol Dial Transplant** 1999 Feb; 14(2): 333-341.

Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. **FASEB J** 1997 Apr; 11(5): 355-364.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. **Bioessays** 2001 Mar; 23(3): 261-269.

Van Eden W, de Vries RR, Mehra NK, Vaidya MC, D'Amaro J, van Rood JJ. HLA segregation of tuberculoid leprosy: confirmation of the DR2 marker. **J Infect Dis** 1980 Jun; 141(6): 693-701.

Vargas MA, St-Louis M, Desgroseillers L, Charli JL, Boileau G. Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway. **Endocrinology** 2003 Nov; 144(11): 4876-4885.

Vidal MC, Bottasso OA, Lehrer A, Puche RC. Altered calcium-binding ability of plasma proteins as the cause of hypocalcemia in lepromatous leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1993 Dec; 61(4): 586-591.

World Health Organization. **World Health Organization Leprosy Elimination Project Status Report 2003 Draft** [on-line]. Geneva: WHO; 2004 [capturado em 20 de julho de 2004] Disponível em: [www.who.int/lep/reports/s20042.pdf](http://www.who.int/lep/reports/s20042.pdf)

World Health Organization. Weekly epidemiological record. **Annual subscription** 2005 Aug; 80(34): 289-296.

Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, Nesbitt T, Drezner MK, Quarles LD. Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts. **Am J Physiol** 1998 Oct; 275(4 Pt 1): E700-E708.

Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Yamashita T, Fukumoto S. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. **J Clin Endocrinol Metab** 2002 Nov; 87(11): 4957-4960.

Zoidis E, Zapf J, Schmid C. Phex cDNA cloning from rat bone and studies on phex mRNA expression: tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) I in vivo. **Mol Cell Endocrinol** 2000 Oct; 168(1-2): 41-51.