

4 - RESULTADOS

Neste trabalho experimental realizou-se uma análise para microarray que foi complementado com a histologia. Assim sendo os resultados estão organizados de acordo com estas duas técnicas.

4.1 – MICROARRAY

A qualidade do RNA utilizado para a realização do microarray é de elevada importância. Deste modo, diversas análises foram efectuadas às amostras para verificar se a qualidade das mesmas era adequada. As amostras que falharam esta avaliação ou que não possuíam valores minimamente aceitáveis foram eliminadas, pois a integridade da amostra (p.e. degradado) induz erros nos resultados do microarray.

4.1.1 – Quantificação do RNA

O pré-requisito absoluto para a obtenção de dados reprodutíveis e de confiança é a elevada qualidade da amostra de RNA a utilizar. Para estudos de expressão genética, pelo procedimento standard, são necessárias 1 µg de RNA total, mas se houver limitações na obtenção de material biológico, pode-se usar o procedimento para pequenas amostras uma vez que este reduz essa quantidade para valores tão baixos quanto 50 ng de RNA total. Para RNA de elevado grau de pureza a razão das absorvâncias a 260 e 280nm (A_{260}/A_{280}) deve ser entre 1,8 e 2,1.

Após extracção do RNA das amostras de pele/escamas dos peixes controlo e sujeitos a tratamento, estimou-se a sua concentração e grau de pureza utilizando o espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 (Figura 1).

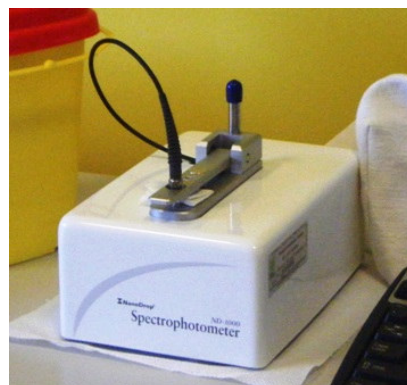


Figura 7 – Imagem ilustrativa do espectrofotómetro NanoDrop.

A qualidade do RNA nessas amostras é analisada usando o RNA 6000 Nano Assay do Agilent 2100 Bioanalyzer.

Se o electroforetograma preencher os parâmetros de qualidade requeridos, procedemos ao processamento da amostra.

A qualidade das amostras nesta fase do procedimento é muito importante, se o RNA estiver degradado não é possível realizar o microarray, porque este tipo de ferramentas requer um elevado grau de pureza, de outro modo reverte em erros no resultado final.

A quantidade de RNA presente nas amostras é de elevada importância para a realização da hibridação, pois só as amostras com uma concentração de RNA igual ou superior a 50 ng/ μ l são fiáveis.

O Agilent Bioanalyser permite uma análise qualitativa e quantitativa de cada amostra de RNA. Nas Figuras 8 e 9 está representada a eletroforese de algumas das amostras de RNA testadas. As duas bandas correspondem às unidades ribossomais do RNA, respectivamente 18S e 28S.

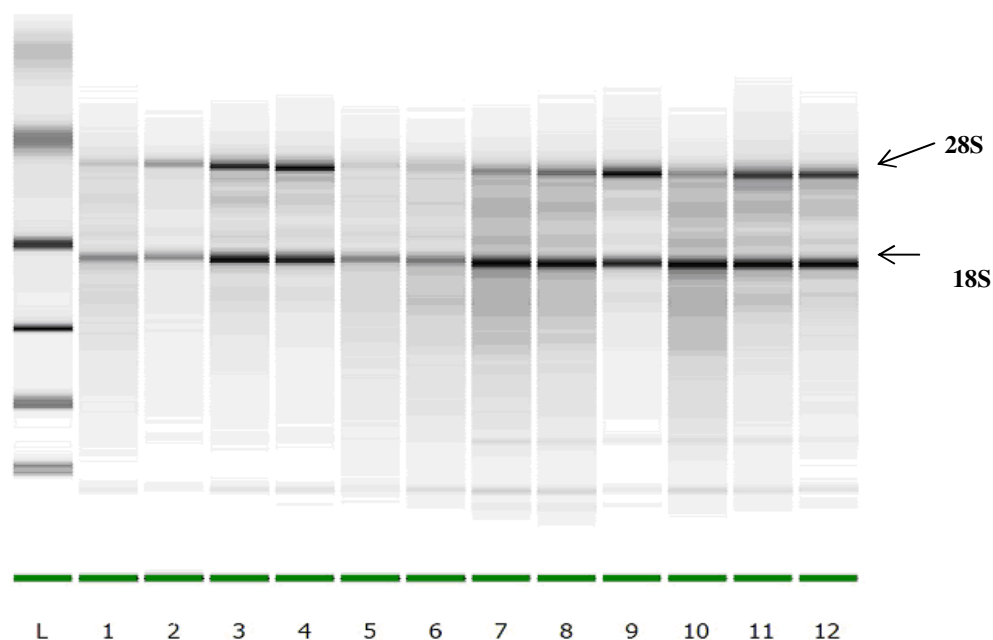


Figura 8 – Análise de electroforese (0,8% agarose) para verificação da qualidade das amostras. L) Marcador do peso molecular; 1 a 12) correspondem a amostras de RNA extraído de pele/escama de peixes diferentes.

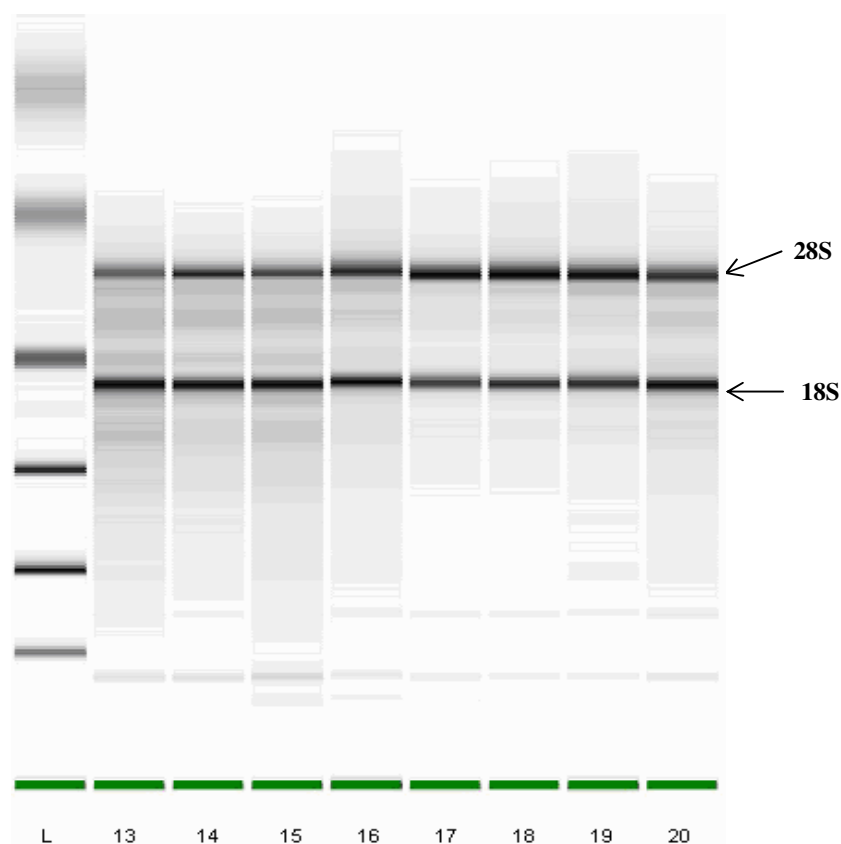


Figura 9 – Análise de electroforese (0,8% agarose) para verificação da qualidade das amostras. **L)** Marcador do peso molecular; **13 a 20)** correspondem a amostras de RNA extraído de pele/escama de peixes diferentes.

Para além da electroforese, o Bioanalyser apresenta um resumo da qualidade do RNA total de cada amostra. Por exemplo, a Figura 10 representa dois electroforetogramas de duas amostras analisadas no Bioanalyser onde se pode ver a diferença entre uma amostra de RNA com boa integridade (Figura 10A) e uma amostra com integridade média (Figura 10B). O primeiro pico dos gráficos corresponde à fluorescência emitida pelo marcador e os outros dois picos correspondem à fluorescência emitida pelas duas unidades ribossomais, 18S e 28S respectivamente. Uma amostra de RNA total com boa integridade tem dois picos bem definidos, que correspondem às unidades ribossomais mais abundantes, e sem background à sua volta. Para além disso, se uma amostra tiver boa qualidade tem uma proporção 28S/18S perto de 2,1. Por outro lado, se a purificação do RNA não for eficiente observam-se vários picos e o gráfico não apresenta linearidade de um pico para o outro, traduzindo-se numa amostra com baixa integridade.

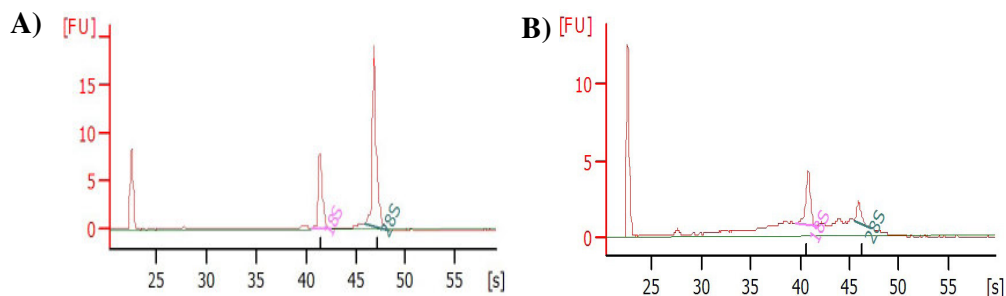


Figura 10 – Electroforetograma das amostras de RNA. Os picos demonstram a fluorescência do marcador e as unidades ribossomais do RNA. **A e B** representam gráficos tipo de uma amostra com boa e média integridade, respectivamente. FU indica a fluorescência por segundos.

O electroforetograma da amostra de RNA total representada na Figura 10B indica que esta possui uma integridade média, o que se traduz num valor de RIN (número de integridade do RNA) de 6,9. Assim sendo, mesmo tendo os picos das unidades ribossomais uma fluorescência pouco elevada, esta amostra é aceitável para ser incluída na hibridação do microarray. Por outro lado, na Figura 11 está representado um exemplo de um electroforetograma de uma amostra de RNA parcialmente degradada, pois é possível observar a existência de uma elevada fluorescência (FU=15) de fundo entre 30-45 segundos, incluindo as regiões de absorvência correspondentes às unidades ribossomais, logo esta amostra possui um valor de RIN baixo e não é aceitável para ser hibridada no microarray.

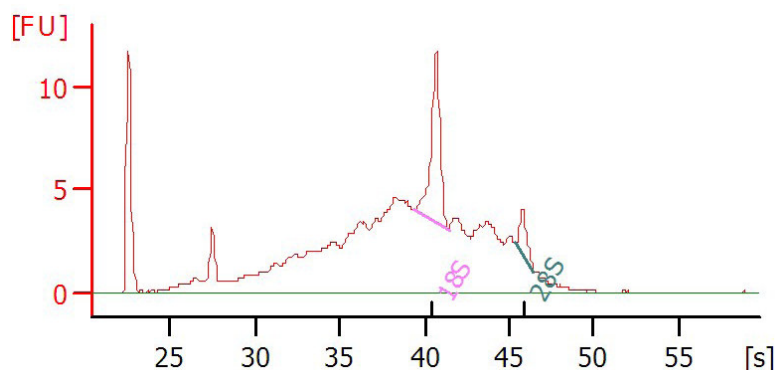


Figura 11 -Electroforetograma das amostras de RNA. Os picos demonstram a fluorescência do marcador e as unidades ribossomais do RNA. FU indica a fluorescência por segundos.

Os parâmetros mensuráveis pelo Bioanalyser são a concentração de RNA, o Rácio 28S/18S e o Número de Integridade do RNA (RIN), sendo este último de maior importância para a hibridação do microarray, pois só as amostras com um RIN superior a 6,5 foram hibridadas. Isto porque o RIN foi concebido para proporcionar uma avaliação inequívoca da integridade do RNA, a partir deste pode-se garantir a repetibilidade da expressão de um gene durante a experiência. Desta forma ajuda-nos na escolha das amostras para posterior análise.

A tabela 2 resume os parâmetros medidos pelo bioanalyzer referentes ao RNA das figuras atrás apresentadas.

Tabela 2 – Resumo da informação e resultados da quantificação do RNA no Agilent Bioanalyser.

	PARÂMETROS		
	Concentração de RNA (ng/ul)	Rácio de rRNA (28S/18S)	Número de Integridade do RNA (RIN)
Figura 10A	132,0	2,1	9,0
Figura 10B	50,0	0,3	6,9
Figura 11	175,0	0,1	5,5

Após o passo de purificação e marcação do RNA, procedeu-se a uma segunda quantificação do cRNA para posterior hibridação. Tendo em conta que na purificação há sempre perdas de amostra, e como a hibridação é um passo sensível, não é convidativo a repetição da análise na totalidade, procedeu-se desta forma a uma segunda quantificação para verificar se a concentração de RNA continua a ser suficiente para prosseguir na experiência. Esta quantificação é necessária para a determinação da quantidade de cRNA a utilizar na hibridação. A concentração de Cyanine 3 e do cRNA são os parâmetros com mais relevância nesta fase, pois só amostras que apresentam um rendimento superior a 1,65 ug e uma actividade específica superior a 9,0 pmol Cye por ug de cRNA sucedem para a hibridação. Desta forma temos viabilidade suficiente para confiar nos resultados, sem que haja margem para que os resultados no final não sejam concisos e fiáveis. A determinação do rendimento e actividade específica foi calculado com indicado a seguir:

$$\text{Rendimento em ug de cRNA} = \frac{[cRNA] \times 30 \mu L}{1000}$$

$$\text{Actividade especifica (pmol Cy3)} = \frac{[Cy3]}{[cRNA]} \times 1000$$

Através desta informação foi possível calcular o volume de cRNA necessário para o rendimento exigido. O volume obtido está descrito na tabela 3, sendo este mesmo volume utilizado na preparação das amostras para a hibridação.

Tabela 3 – Resumo das análises efectuadas às amostras, os dados foram obtidos através do nanodrop.

Amostra	Conc. ng/μl	Média	Cy3 (pmol/μl)	Média	Actividade Especifica	Vol / 1,65 μg
1	135.2	137.75	1.8	1.9	13.79	11.98
	140.3		2			
2	125.3	127.1	1.6	1.55	12.20	12.98
	128.9		1.5			
3	100.8	102.65	1.1	1.1	10.72	16.07
	104.5		1.1			
4	123	122.45	1.5	1.55	12.66	13.47
	121.9		1.6			
5	93.9	94.15	1.1	1.1	11.68	17.53
	94.4					
6	119.8	120.65	1.1	1.05	8.70	13.68
	121.5		1			
7	188.1	188.8	1.7	1.75	9.27	8.74
	189.5		1.8			
8	97.1	97.3	0.9	0.9	9.25	16.96
	97.5		0.9			
9	124.4	124.4	1.1	1.15	9.24	13.26
	124.4		1.2			
10	181.4	181.25	1.6	1.55	8.55	9.10
	181.1		1.5			
11	83.5	82.55	1.1	1.05	12.72	19.99
	81.6		1			
12	100.3	100.6	1.1	1.05	10.44	16.40
	100.9		1			

13	102	101.75	1	1.05	10.32	16.22
	101.5		1.1			
14	97.5	97.45	1.1	1.15	11.80	16.93
	97.4		1.2			
15	206.5	207.3	1.7	1.75	8.44	7.96
	208.1		1.8			
16	101.5	101.25	1.1	1.05	10.37	16.30
	101		1			
17	69.3	70.25	0.9	0.9	12.81	23.49
	71.2		0.9			
18	90.5	90.9	0.9	0.9	9.90	18.15
	91.3		0.9			
19	100.7	100.75	0.9	0.9	8.93	16.38
	100.8		0.9			
20	114.9	115.55	1.7	1.75	15.14	14.28
	116.2		1.8			

Após o “scanning” e extracção das características do slide do Microarray, o software apresenta uma série de informação acerca da qualidade da amostra analisada. O software atribui um protocolo previamente definido para a extracção dos resultados em questão, este carrega um conjunto de parâmetros e definições que irão afectar o processo e subsequentes resultados. Os parâmetros pedidos são: formato do array, protocolo, grelha modelo, modelo estatístico para avaliar os valores dos pixels, entre outros que estão definidos por defeito no protocolo utilizado. Contudo estes parâmetros dependem sempre do tipo de microarray, protocolo usado no laboratório, formatos do array e do scanner utilizado.

O protocolo usado nesta experiência foi o GE1-v5_95_Feb07, que é utilizado para avaliar a expressão genética usando uma única cor de fluorescência.

O output do software apresenta o relatório dos dados através de vários gráficos onde se pode visualizar os vários parâmetros analisados e consequentes resultados. No relatório será possível verificar a qualidade das amostras, através dos gráficos e imagens do array (fluorescência). Os resultados apresentados posteriormente são alusivos ao output deste tipo de protocolo.

A Figura 12 representa de uma forma geral a qualidade da hibridação e lavagens. Na figura 12B pode-se observar um decréscimo na qualidade, tal facto pode dever-se à hibridação ou às lavagens com os diversos tampões não terem ocorrido com a eficiência desejada. Neste caso específico as várias lavagens não foram suficientes, porque aparece um laivo no array, como se pode visualizar na imagem. Quando esta situação se verifica procede-se novamente à hibridação desta amostra.

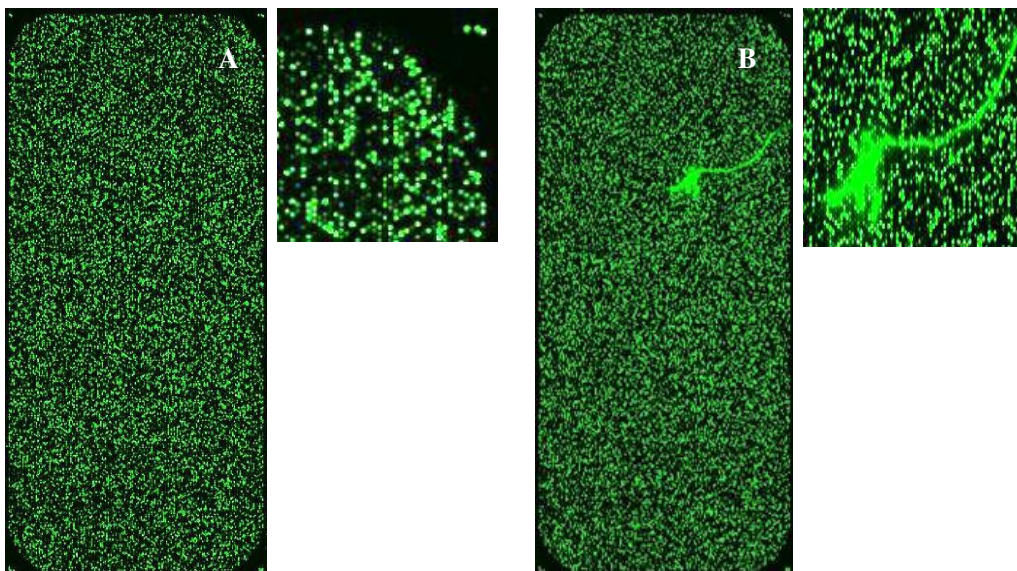


Figura 12 – Imagens obtidas após o scanning. A) Imagem com qualidade; B) Imagem sem qualidade.

Os histogramas abaixo representados são um exemplo do output do protocolo utilizado. O objectivo deste histograma é mostrar o nível do sinal e a forma de distribuição ao longo do eixo dos XX do mesmo. As linhas correspondem ao número de pontos com intensidade *versus* o log do sinal processado.

A curva do gráfico deve aproximar-se o mais possível de uma distribuição normal, pois demonstram uma maior qualidade de hibridação (figura 13A).

O histograma (figura 13B) descreve um resultado do “scanning” onde é possível observar uma curva que não corresponde a uma distribuição normal, contudo esta amostra não necessitou de repetição porque os valores do declive e desvio-padrão respectivamente apresentam números admissíveis.

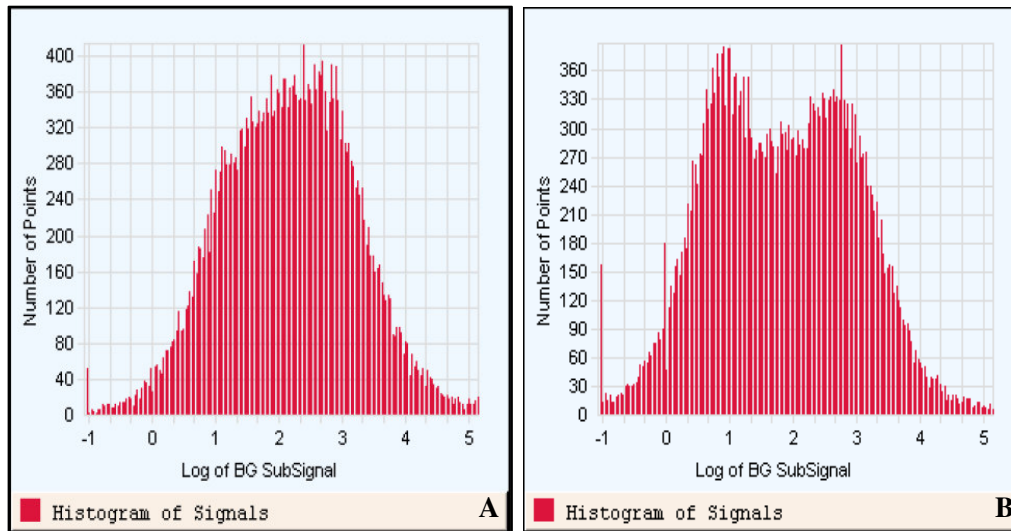


Figura 13 – Histograma referente ao sinal da amostra. Representa o nº de pontos vs Log do sinal de fundo processado. Pretende ilustrar se o sinal corresponde a uma distribuição normal. **A)** Histograma com uma distribuição normal; **B)** Histograma com uma distribuição que não corresponde a uma distribuição normal.

A figura 14 bem como as tabelas seguintes caracterizam mais uma vez um dos resultados do protocolo aplicado para a extracção das características do array. O gráfico mostra a curva de dose/ resposta dos picos desde o limite de detecção até ao ponto de saturação.

Com altos níveis de sinal as barras de erros são pequenas desde que o scanner alcance a saturação neste ponto. Ambos os sinais e desvios padrões são subestimados (“underestimated”) porque os dados da saturação não são excluídos do cálculo.

Com baixos níveis de sinal as barras de erro são visíveis porque o sinal está a decair até ao ruído de fundo. O nível do sinal no topo das barras de erro das amostras (“features”) permite uma primeira estimativa do limite de detecção mais baixo. Sinais a este nível podem ser ligeiramente sobrestimados e o erro subestimado porque sinais abaixo de zero são excluídos do cálculo.

Os dados mais fiáveis da “Feature Extraction” são encontrados na amplitude do sinal onde o sinal aumenta linearmente com a concentração do alvo.

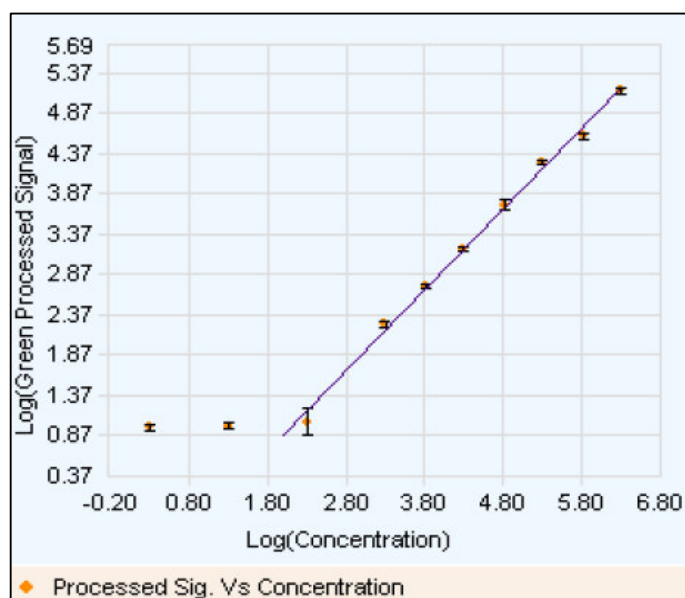


Figura 14 – Gráfico representativo da linearidade do Spike-in. Eixo dos YY representa o Log do sinal processado, que imite fluorescência verde, da amostra, o eixo do XX corresponde à concentração da amostra.

A tabela abaixo descreve os parâmetros relacionados com a figura 14. Os valores do declive e do erro são os de maior expressividade para a análise qualitativa do array nesta fase da experiência. Quanto mais próximo de 1 se encontrarem estes dois parâmetros, melhor qualidade fruía a amostra.

Tabela 4 – Síntese dos dados obtidos através do gráfico da linearidade do Spike-in

Low Signal	0.84
High Signal	5.75
Low Relative Concentration	1.97
High Relative Concentration	6.87
Slope	1.00
R ² Value	1.00

A figura 15 e a tabela 5 representados abaixo, mostram resultados com menor qualidade a nível dos parâmetros mensuráveis. Contudo a amostra relativa ao gráfico foi aceite para a análise seguinte. Esta amostra apresenta um erro devido ao facto de possuir uma concentração de RNA próximo do valor mínimo aceitável, contudo prosseguiu para a

hibridação pois os parâmetros relativos ao erro e desvio-padrão apresentam valores bastante admissíveis.

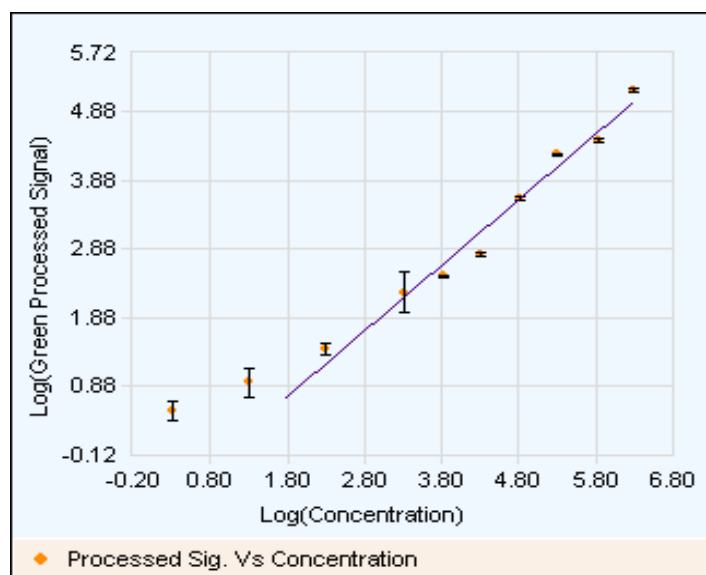


Figura 15 – Gráfico representativo da linearidade do Spike-in. Eixo dos YY representa o Log do sinal processado, que imite fluorescência verde, da amostra, o eixo do XX corresponde à concentração da amostra.

A tabela seguinte mostra o resultado de uma análise com inferior qualidade, pois o declive e o desvio-padrão foram inferiores a um, contudo o facto não é suficientemente expressivo para que esta amostra seja repetida, pois o erro é mínimo.

Tabela 5 – Síntese dos dados obtidos através do gráfico da linearidade do Spike-in

Low Signal	0.73
High Signal	5.75
Low Relative Concentration	1.78
High Relative Concentration	7.07
Slope	0.95
R ² Value	0.98

Com a informação cedida por estes valores e através da avaliação e da confiabilidade da intensidade estimada para cada local de hibridação pode-se passar à fase seguinte, a normalização dos dados do microarray.

4.1.2 Normalização

O SAM (Significance Analysis of Microarrays) é uma técnica estatística para encontrar um conjunto de genes na experiência do microarray. O input do SAM é a expressão genética medida a partir do conjunto das amostras do microarray, bem como a resposta de uma variável. A resposta da variável pode ser agrupada como tratado e não tratado, um grupo de multi classes (p.e. cancro da mama, cancro do cólon e linfoma), ou ainda variável quantitativa (como pressão arterial).

O SAM mede em termos estatísticos a força da relação entre a expressão genética e a resposta da variável, usa permutações repetidas dos dados para determinar se a expressão de quaisquer genes são significativamente relacionados com a resposta.

Os dados deverão ser colocados numa folha de Excel, a primeira linha da folha tem informações sobre a medição da resposta, as demais linhas têm dados referentes à expressão genética, uma linha por gene. As colunas representam as diferentes amostras.

Os dados de oligonucleótidos necessitam de uma calibragem forte: por exemplo, uma normalização linear dos dados de cada amostra versus a linha-wise média para todas as amostras.

O boxplot deve representar graficamente grupos de dados numéricos através do seu resumo, neste caso cinco amostras por grupo. As barras brancas representam as amostras, onde se pode visualizar a média (traço preto). Na normalização os dados são submetidos a um programa que aproxima os dados a uma distribuição normal de forma a dar um aspecto homogéneo a todas as barras.

O esquema representa um exemplo das barras da figura 17. Neste caso as amostras não admitiram uma distribuição normal, como se pode observar pelo exemplo. Neste caso os quartis não apresentam valores semelhantes, daí a variação da barra da mediana da fluorescência (barra preta)

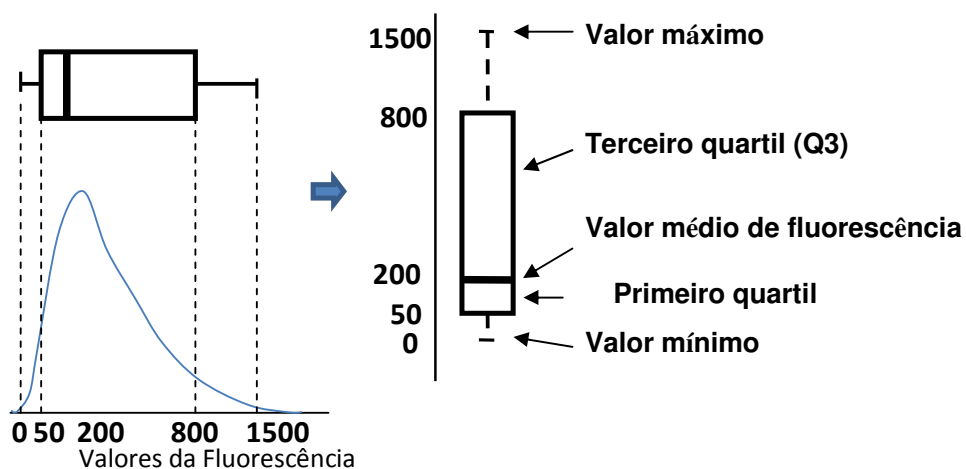


Figura 16 – Representação esquemática dos resultados da normalização

Os gráficos abaixo resultam da análise estatística SAM, onde os locais com fraca intensidade e com sondas de valor zero são eliminadas.

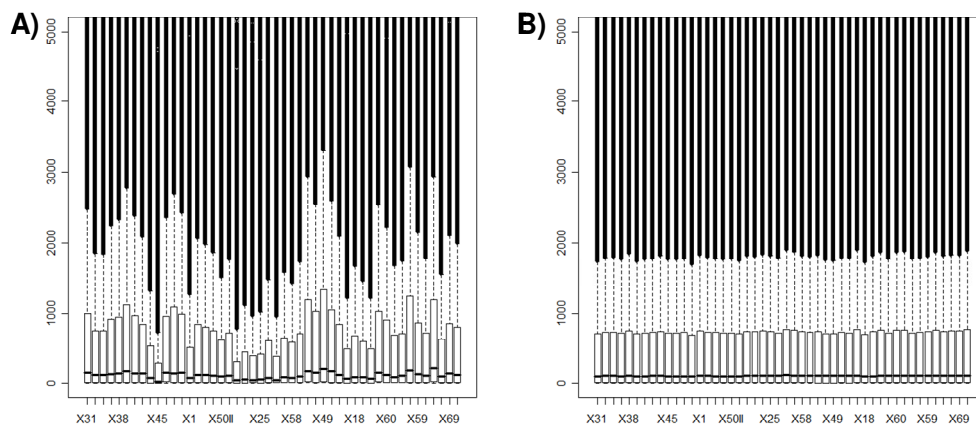


Figura 17 – Boxplot dos dados do microarray. A) Mostra os resultados antes da normalização; B) Mostra os resultados após a normalização.

4.1.3 Análise descritiva em termos de sondas

O microarray utilizado neste trabalho prático consiste em 19.715 clusters alvo de dourada, dos quais 19.664 foram caracterizados por duas sondas que não se sobrepõem, e 51 foram caracterizadas por uma sonda simples. O facto de cada gene estar representado por duas sondas aumenta a qualidade da análise.

Os dados da expressão foram seleccionados conforme a falta de locais de intensidade por sonda. Sondagens com mais do que um local errante ao longo dos duplicados da amostra foram removidas da análise, neste caso 3122 sondas foram removidas, representando 8,6% do número total de sondas.

4.1.3.1 Análise estatística dos grupos

Com o objectivo de avaliar o efeito da diminuição do cálcio nos peixes após 3 e 7 dias, efectuou-se uma análise estatística para comparar a expressão entre os grupos em estudo e os grupos controlo, utilizando o programa SAM,

Up-regulação é um processo que ocorre dentro de uma célula, desencadeado por um sinal (de origem interna ou externa em relação à célula), que resulta num aumento da expressão de um ou mais genes. Inversamente down-regulação é um processo que resulta numa diminuição da expressão de um ou mais genes.

No grupo de 3 dias, a comparação entre o controlo e o grupo sem escamas indica uma diferença na regulação dos genes, superior ao grupo de 7 dias, como descreve a tabela abaixo. Os genes positivos (up regulated) correspondem aos grupos controlo, com escamas, por sua vez os genes negativos (down regulated) equivalem aos grupos sem escamas. O facto do grupo referente aos 7 dias apresentar menos diferenças, indica uma resposta mais específica.

Tabela 6 – Resumo da regulação das sondas dos grupos referentes aos 3 e 7 dias.

Grupos comparados		Sondas Down regulated	Sondas Up regulated
3 N	3 WS	165	82
7 N	7 WS	6	8

Assim sendo, no grupo de peixes 3 dias após a remoção de escamas existe um total de 247 sondas diferencialmente expressas em relação ao controlo do dia 3. Dessas, 82 estão up-reguladas e as restantes down-reguladas. Por outro lado, no grupo dos peixes 7 dias após a remoção de escamas as sondas diferencialmente expressas são apenas 14.

A análise dos dados permite uma avaliação em termos da anotação GO (Gene Ontology), em relação à percentagem de entradas de acordo com a classificação de processos biológicos, componentes celulares e função molecular.

A classificação dos genes diferencialmente expressos quanto à sua Ontologia (GO do inglês “Gene Ontology”), nomeadamente quanto ao processo biológico envolvido, identificou apenas 27% dos transcritos “up-regulated” no grupo tratado em relação ao controlo do dia 3. Desses, 31% estão envolvidos em processos metabólicos, que representam as reacções e vias bioquímicas, incluindo anabolismo e catabolismo, pelo qual os organismos vivos transformam substâncias químicas. Processos metabólicos que tipicamente transformam moléculas pequenas, mas também incluem processos macro moleculares como a replicação e reparação do DNA, e síntese e degradação proteica. Nomeadamente, a proteína ubiquitina que desempenha uma função importante na regulação de proteínas, pois marca proteínas indesejadas para que sejam degradadas por organelos chamadas proteassomas.

Inversamente, só 13 (27%) dos genes down-regulated no grupo tratado amostrado no dia 3 tem um ou mais processos biológicos associados. Desses, 23% estão envolvidos em processos celulares, 23% com o sinal de transdução que caracterizam processos em cascata de pelos quais um sinal interage com um receptor, provocando uma mudança no nível de actividade de um segundo mensageiro ou outra célula alvo a jusante e, finalmente, efectua uma alteração no funcionamento da célula; por fim 23% estão relacionados com a resposta imune, esta resposta é um processo biológico crucial para a sobrevivência do peixe após ausência de escamas. Representa uma resposta de um organismo para com uma ameaça potencial interna ou invasiva.

Processo Biológico

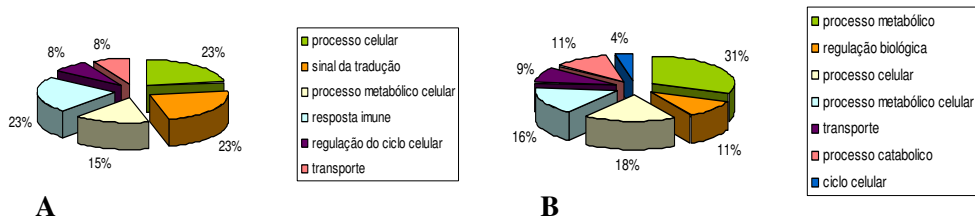


Gráfico 1 – Anotação GO de acordo com a classificação de processo biológico. O gráfico A representa a classificação para down-regulated e o B para up-regulated.

Por outro lado, na classificação GO associada à componente celular obteve-se 38 dos transcritos, desses 82% representam genes up-regulated, dos quais 33% estão relacionados com uma componente intracelular e 29% representam componentes do citoplasma. Por outro lado 18% correspondem a genes down-regulated, dos quais 78% corresponde a componentes existentes na membrana dos tecidos.

Componente Celular

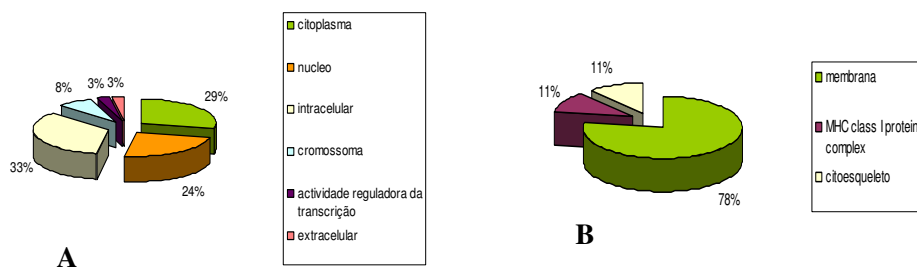


Gráfico 2 – Anotação GO de acordo com a classificação de componente celular. O gráfico A representa a classificação para down-regulated e o B para up-regulated.

Função Molecular

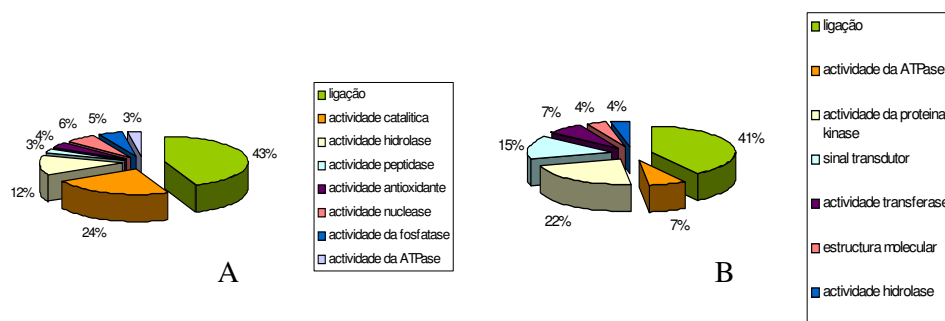


Gráfico 3 -Anotação GO de acordo com a classificação de função molecular. O gráfico A representa a classificação para up-regulated e o B para down-regulated.

Por fim no que diz respeito à definição GO associada à função molecular foram classificados 135 transcritos, dos quais 80% dos transcritos classificados correspondem a genes up-regulated e 20% a down-regulated. Através da análise do gráfico 3 pode verificar-se que as funções moleculares são bastante semelhantes entre os grupos.

No grupo alusivo ao tempo de amostragem de 7 dias, obtive 11 transcritos up-regulated e 8 down-regulated. Na classificação GO associada aos processos biológicos obteve-se 22%, em relação à componente molecular obteve-se igualmente 22%, por outro lado na classificação associada à função molecular obteve-se 56%, dos quais 50% encontram-se relacionados com a função de ligação célula-célula.

A tabela 6 refere-se à classificação GO do grupo referente aos 7 dias, no que diz respeito ao processo biológico, componente celular e função molecular.

Tabela 7 – Classificação GO relativa ao grupo de amostragem correspondente ao 7º dia.

Processo Biológico	Componente celular	Função molecular
Processo celular	Filamento intermediário	Actividade estrutural de proteína
Processo de modificação de proteínas	Intracelular	Actividade catalítica
Regulação da apoptose		Actividade ligase
		Ligação

4.2 – HISTOLOGIA

Uma outra abordagem para analisar o efeito da manipulação dos reservatórios internos de cálcio foi a aplicação de técnicas de histologia. Nesta parte do trabalho experimental analisou-se a morfologia de pele de peixe sujeitos a diferentes tratamentos, utilizando diversas técnicas de histologia e imunohistoquímica. O objectivo da presente análise foi a avaliação das consequências morfológicas de remoção de escamas e a sua subsequente regeneração durante 3 e 7 dias em relação ao controlo.

4.2.1 Organização geral da pele dos peixes

Iniciou-se com uma caracterização da pele de dourada, utilizando a técnica de hematoxilina-eosina. Nesta figura podem distinguir-se as diferentes camadas da pele características dos teleósteos: a epiderme (EP), as escamas (S) e a derme. Os diferentes padrões de cores obtidos nesta coloração dependem das propriedades tintoriais dos tipos celulares presentes em cada zona.

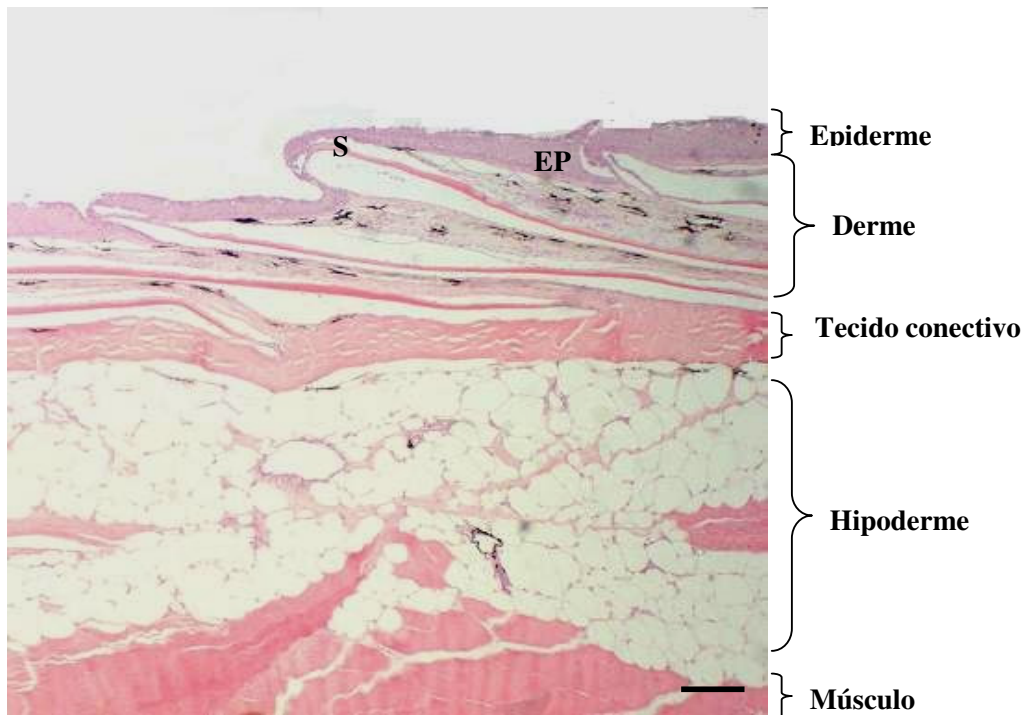


Figura 18 – Secção da pele removida da região dorsal de uma dourada juvenil. Coloração com hematoxilina-eosina. A organização geral do tecido é indicada na figura. S (escama); EP (epiderme). ——— corresponde a 1cm.

Na figura 19 encontram-se fotografias de secções longitudinais da pele com/ sem escamas de *S. aurata* coradas com a técnica de hematoxilina-eosina. Após remoção das escamas os tecidos apresentam diferenças significativas no tecido com 3 dias sem escamas verifica-se a falta das escamas (zona rosa compacta no controlo), observa-se a epiderme e a derme com o scale pocket. No tecido com 7 dias após remoção das escamas observa-se uma diferenciação entre a matriz primária e a camada externa, observa-se a formação de novas escamas (zona rosa claro) na camada externa da derme. Verifica-se uma proliferação na camada basal no tecido com 7 dias após remoção de escamas em relação ao controlo e tecido de 3 dias.

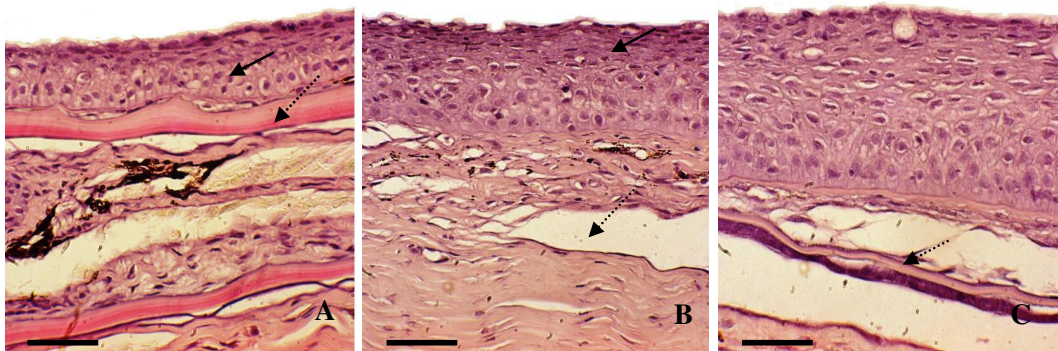


Figura 19 – A controlo; B sem escamas 3 dias; C sem escamas 7 dias. A) a seta preta indica a epiderme, a seta tracejada as escamas (cor rosa compacta); B) a seta preta indica a epiderme, a seta tracejada indica o “scale pocket” onde se encontravam as escamas inicialmente. C) a seta tracejada indica uma escama recém-formada. ——— Corresponde a 1cm.

4.2.2 Histoquímica

A histoquímica é uma técnica histológica que tem por objectivo a identificação da natureza química de constituintes celulares. Consiste na coloração específica desses constituintes, recorrendo basicamente a substâncias que, reagindo com os componentes celulares, dão origem a produtos corados. Esta técnica contrasta com a coloração histológica comum, acima referida, na medida em que esta última se baseia na absorção, pelas estruturas, de substâncias coradas (os corantes), enquanto que na histoquímica, as cores são propriedade de produtos que se formam *in situ*. Por exemplo identificar células (osteoclastos) através da actividade enzimática com o TRAP, que é um marcador destas mesmas células.

4.2.2.1 Demonstração da actividade da TRAP – fosfatase acida resistente ao tartarato

A enzima TRAP utilizou-se nos procedimentos histológicos como marcador de osteoclastos. Esta, quando presente nos tecidos, mostra uma coloração rosa. Tanto nos tecidos recolhidos 3 e 7 dias após o tratamento, o sinal da TRAP na região da camada basal é pouco expressivo. Contudo, verifica-se coloração em algumas células em tecido com escamas. Nos tecidos sem escamas não há sinal positivo, como se pode verificar na figura 20.

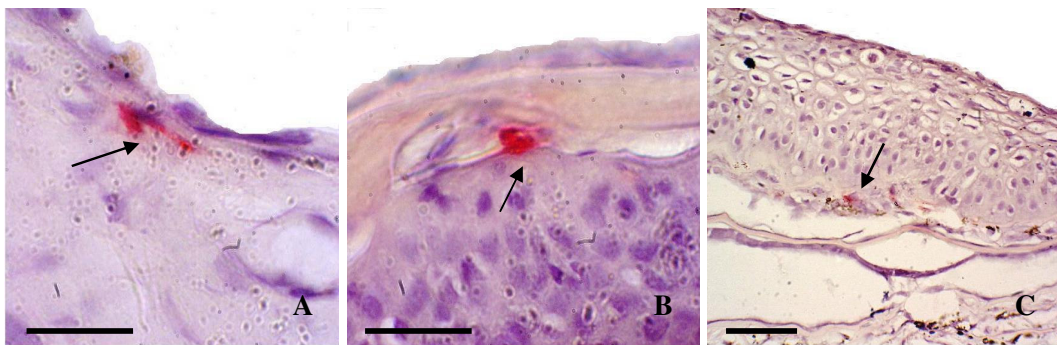


Figura 20 – Distribuição da intensidade do sinal detectado com a enzima TRAP. No tecido (A), 3 dias com escamas, a seta indica o sinal (cor avermelhada); (B) e 7 dias com escamas a seta indica o sinal; (C) 7 dias sem escamas, a seta indica o sinal. ——— corresponde a 1cm, ——— 1,5cm.

No tecido sem escamas, só ao final dos 7 dias foi possível visualizar actividade, apresentando esta uma coloração fraca (figura 20C).

4.2.3 Imunohistoquímica

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) permitem identificar, mediante a utilização de anticorpos específicos, a presença de diversas substâncias antigénicas presentes no tecido, sendo de grande valor nos diagnósticos anatomopatológico e na investigação científica. Consiste no uso de anticorpos a partir de um animal imunizado com a substância que se pretende detectar. As secções dos tecidos são incubadas com o anticorpo assim obtido e este irá ligar-se-á ao antígeno específico presente no tecido.

No presente trabalho a técnica de imunohistoquímica foi utilizada para identificar e localizar células onde se expressam a osteonectina (OSN), *Acidic and secreted protein in cartilage* (ASPIC) e antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA).

4.2.3.1 Expressão da osteonectina

A partir desta técnica identificou-se a expressão da osteonectina nos tecidos (figura 21), a expressão do sinal segue um padrão onde nos tecidos relativos aos 3 dias é superior aos dos 7 dias. A expressão de OSN é mais frequente e intensa nas zonas próximas da camada basal. Este marcador não sendo específico para osteoblastos, surge nos tecidos mostrando que nesta zona (membrana basal) existe cálcio. A figura 21C mostra expressão do sinal no tecido 7 dias sem escamas, representada pela linha muito ténue assinalada com uma seta.

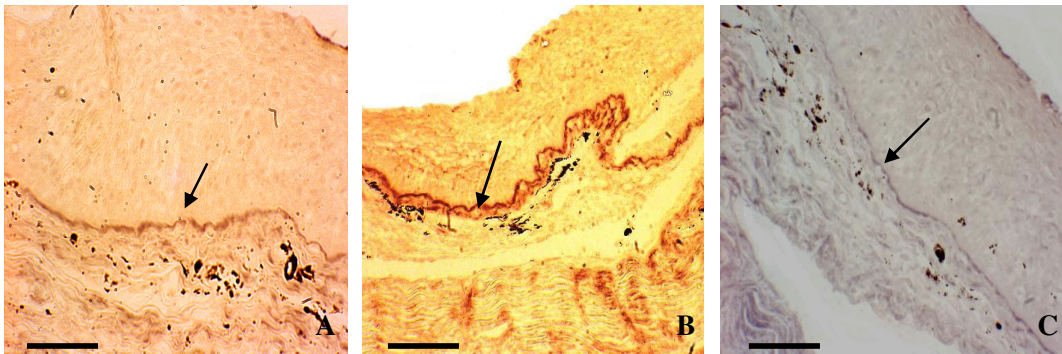


Figura 21 – Distribuição da intensidade do sinal detectado após imunohistoquímica com anti-OSN. **A)** Tecido 3 dias com escamas; **B)** Tecido 7 dias com escamas; **C)** 7 dias sem escamas. As setas indicam o local onde se verificou o sinal. — 1 cm.

4.2.3.2 Expressão do PCNA – antígeno nuclear de células proliferativas

O PCNA permite a detecção de células em proliferação na epiderme. Este marcador possibilita a visualização dos núcleos das células em proliferação nas amostras em estudo.

Nas amostras dos 3 e 7 dias após remoção de escamas visualiza-se um número elevado de células em proliferação com os núcleos corados (ver imagem Figura 22) em relação aos tecidos controlo. As células com uma reacção intensa com anti-PCNA situam-se na camada basal, entre a epiderme a derme, formando uma área compacta. Este resultado é esperado uma vez as células basais proliferam gerando novas células da epiderme.

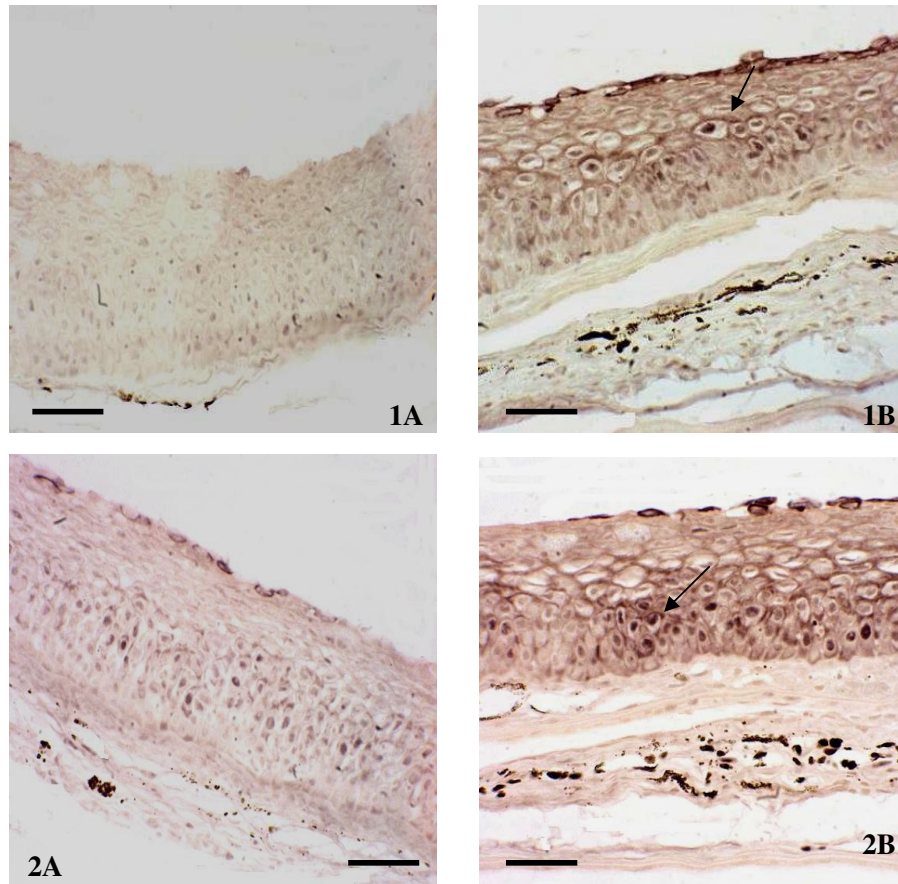


Figura 22 – Distribuição da intensidade do sinal detectado após imuno com anti-PCNA. **A)** Tecido referente 3 dias. **1A** controlo. **1B** sem escamas. **B)** Tecido referente aos 7 dias. **2A** controlo. **2B** sem escamas. As setas indicam os núcleos em proliferação. ——— corresponde a 1cm.

4.2.3.3 Expressão da ASPIC

Nos cortes sem escamas observa-se uma coloração forte de tom escuro na periferia das células, demonstrando o sinal positivo da ASPIC (figura 23). Nos cortes representativos de tecido com escamas o sinal é de menor intensidade (figura 1A e 2A). Sendo um gene recentemente anotado, (Redruello et al., a publicar) não se conhece totalmente a sua função, verifica-se a sua presença com um sinal intenso nos tecidos relativos a 3 dias sem escamas, diminuindo esse sinal no grupo com 7 dias após a remoção das escamas. Observa-se também uma modificação a nível da membrana basal, local onde se observam as diferenças referidas anteriormente.

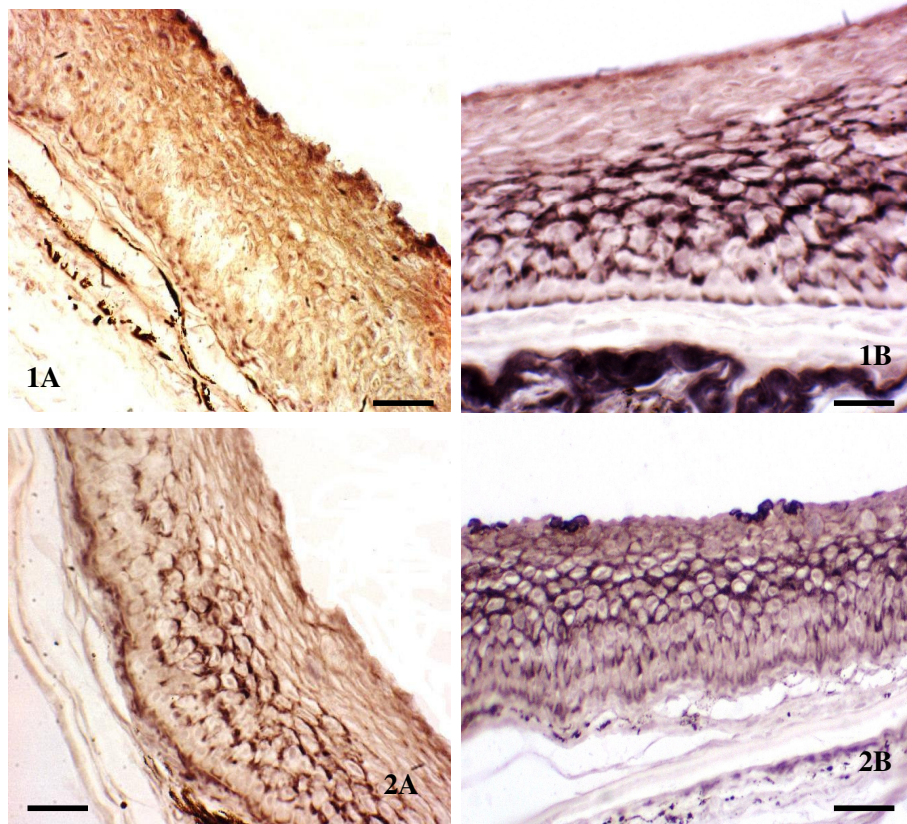


Figura 23 – Distribuição da intensidade do sinal detectado após inumo com anti-corpo ASPIC. **A)** Tecido referente aos 3 dias. **1A** controlo. **1B** sem escamas. **B)** Tecido referente aos 7 dias. **2A** controlo. **2B** sem escamas. ——— corresponde a 1cm.