

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental desenvolvido para esta tese de mestrado baseou-se em duas partes distintas, mas que se complementam, sendo elas biologia molecular, onde se inclui o microarray, e histologia.

3.1 Material biológico

A dourada (*Sparus aurata L.*) é um peixe marinho teleósteo pertencente à família dos *Sparidae*. Os Sparids apresentam uma elevada importância para as pescas e aquacultura, com um excelente valor comercial. A dourada é um dos peixes mais distintos, com uma produção média de 100 milhões de toneladas métricas por ano. A dourada ostenta uma elevada importância para o aquacultura marinha devido ao crescente número de estudos em diversas áreas, tais como, imunologia, endocrinologia, morfologia do osso, fisiologia do músculo e morfologia da pele/escamas.

O fluxograma da figura 4 resume as técnicas utilizadas no decorrer deste trabalho experimental.

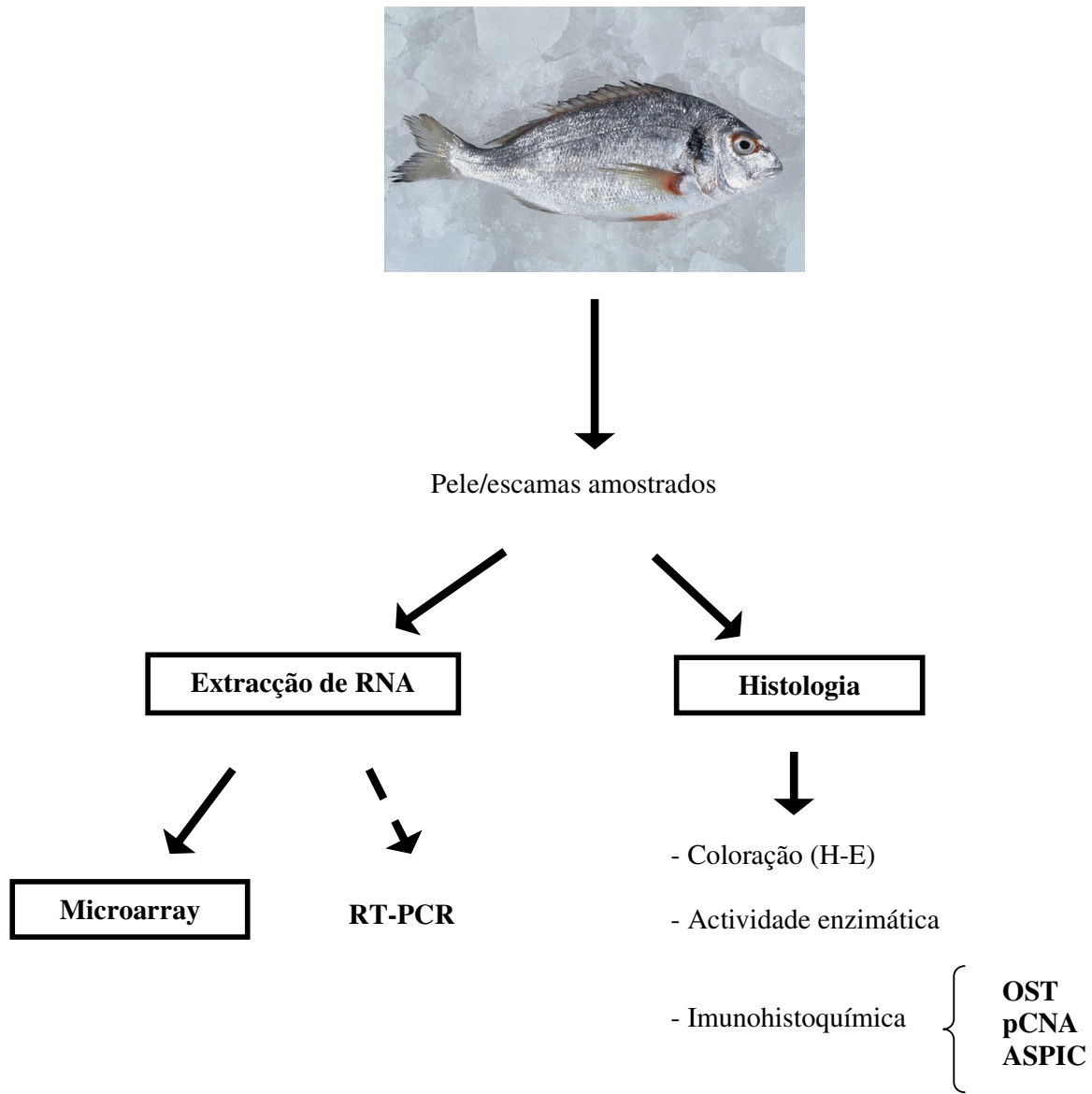


Figura 4 – Fluxograma – visão geral de metodologia (integração e outcome). A seta a tracejado representa uma parte do trabalho que não foi realizada durante o decorrer da minha tese.

3.2 Manipulação experimental

No decorrer do presente estágio uma experiência com douradas foi efectuada tendo como principal objectivo o estudo do efeito da diminuição dos reservatórios internos de cálcio e de fosfato. A experiência desenvolvida para este mestrado encontra-se incluída numa experiência de maior amplitude. Seguidamente apresenta-se uma breve descrição da experiência.

3.3 Desenho experimental

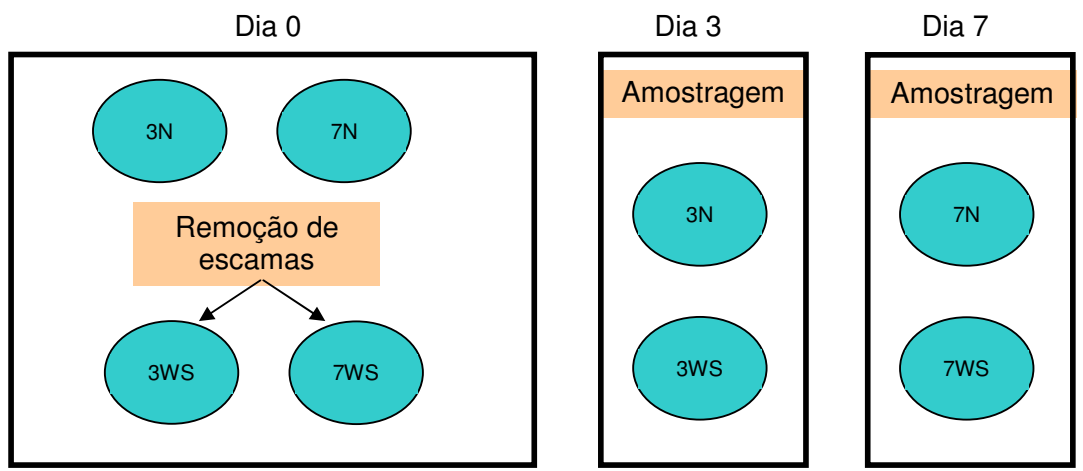


Figura 5 – Esquema experimental.

Nesta experiência utilizaram-se 40 douradas juvenis (*Sparus auratus*) com um peso aproximado entre os 70 e 100 grs disponíveis na Estação Experimental do Ramalhete. As douradas foram divididas em 4 grupos de 8 indivíduos e mantidos em 5 diferentes tanques com água salgada normal e alimentadas com Dourasoja 3 mm durante uma semana para aclimatização. Dos 4 tanques manipularam-se os peixes de dois deles de forma a diminuir o reservatório interno de cálcio e fosfato disponíveis. Ao fim de 3 e 7 dias, após a manipulação do reservatório interno fez-se a amostragem de 8 peixes de cada tanque (3N e 3WS após 3 dias e 7N e 7WS após 7 dias) em que se anestesiaram os peixes com 2-fenoxietanol (1:10000) e colheu-se sangue com seringas de 1ml heparinizadas. O sangue colectado, foi centrifugado (10000 rpm durante 5 minutos) e o plasma armazenado a -20°C. Os peixes foram sacrificados por secção da medula espinhal e retiraram-se pele/escamas (sem músculo), os tecidos foram rapidamente congelados

.....
em azoto líquido. A pele para histologia também foi recolhida e colocada imediatamente em paraformaldeído (PFA) 4% (anexo).

A pele/escamas retiradas dos peixes foram fixadas em PFA 4% e guardadas a 4°C para posterior utilização para imunohistoquímica. Este tecido foi recolhido em tempos diferentes (0, 3 e 7 dias após remoção das escamas) de forma a apanhar várias fases de regeneração, o surgimento e crescimento de escamas nas zonas de intervenção. A pele/escamas removidas e armazenadas a -80°C foram posteriormente utilizadas na técnica de microarray, para isso efectuou-se a extracção de RNA total.

3.4 Microarray

A DNA microarray é uma tecnologia que emprega um número elevado de genes numa só análise, utilizada na biologia molecular e medicina. Esta tecnologia consiste numa série ordenada de milhares de pontos microscópios de oligonucleótidos de DNA, chamados “features”, cada ponto contém picomoles de uma sequência específica de DNA. Esta sequência pode ser uma pequena parte de um gene, que posteriormente será usada como sonda para hibridar amostras de cDNA (complementary DNA) ou cRNA (complementary RNA) sob condições rigorosas. A hibridação da sonda-alvo é usualmente detectada por fluorescência para determinar a abundância relativa da sequência do ácido nucleico no chip (Figura 6) (Ton *et al.*, 2002).

A técnica de microarray foi realizada em Pádua, Itália sob a supervisão do Dr. Luca Bargelloni. O RNA previamente extraído foi enviado para Pádua, onde se efectuou a quantificação do RNA e todo o processo do microarray, utilizando o sistema de One-Color-Array da Agilent. A subsequente análise dos dados foi realizada no Grupo de Endocrinologia Molecular e Comparada (CCMAR), Faro.

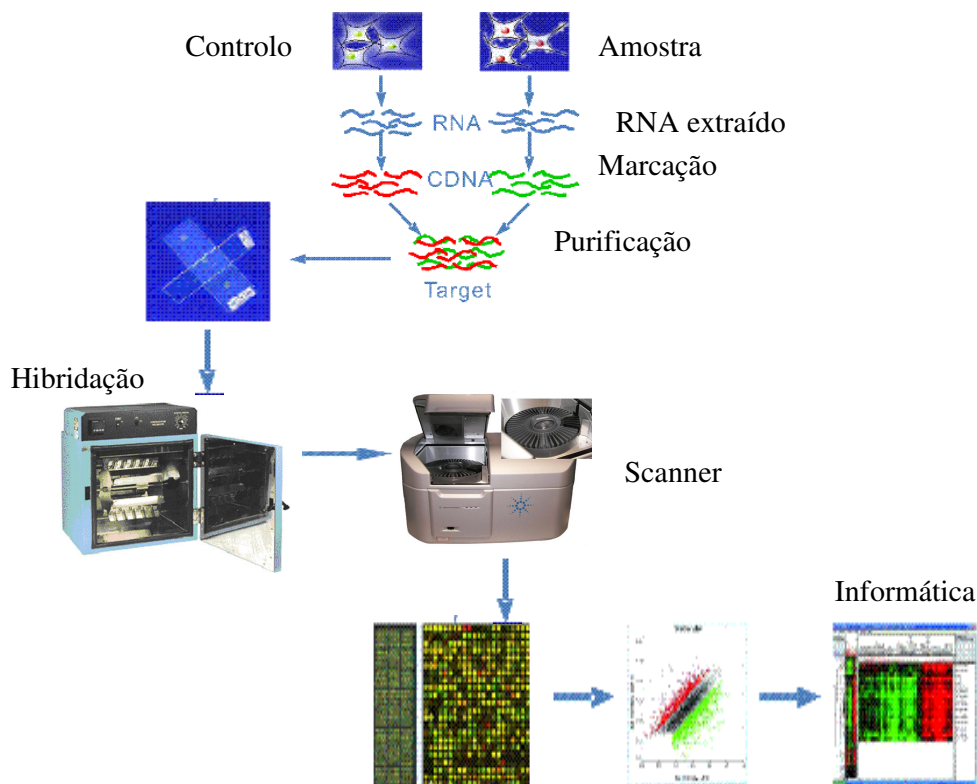


Figura 6 – Esquema representativo das etapas, de uma forma geral, que constituem a técnica do microarray. (Adaptado de www.biotoools.eu/arrays.html).

3.4.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de pele/escamas de dourada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Antes de iniciar o protocolo deve-se adicionar 10 µl de B-mercaptoetanol por 1 ml de tampão RLT e adicionar 4 volumes de etanol ao tampão RPE, este passo é importante pois o tampão RPE vai auxiliar a concentração da amostra.

Este kit permite o uso de tecido congelado até 30 mg, este tecido é homogeneizado e suspenso com o tampão RLT que auxilia a lise celular, de seguida adiciona-se etanol ao lisado, para criar condições que promovam a ligação do RNA (selectivo) à membrana RNeasy. A amostra é colocada numa coluna RNeasy Mini spin e o RNA

total liga-se à membrana, os contaminantes são lavados de forma eficiente e o RNA de alta qualidade é eluído em água livre de RNases.

As amostras de tecido foram pesadas (~50 mg) e desfez-se num almofariz com azoto líquido. Descartou-se o tecido em pó para um eppendorf de 2 ml arrefecido em azoto. Adicionou-se 600 ul de RLT buffer e homogeneizou-se passando o lisado por uma agulha acoplada a uma seringa (1 ml) estéril. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm durante 3 minutos para remover o sobrenadante. Adicionou-se 1 vol de etanol 70% ao sobrenadante e misturou-se com a pipeta. Transferiu-se a amostra para uma coluna (RNeasy spin) colocada sobre um tubo colector de 2 ml e centrifugou-se 30 segundos a 11000 rpm.

Descartou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Adicionou-se 700 ul de buffer RW1, este tampão actua no tratamento das DNases, incubou-se 5 minutos para eliminar DNA genómico. Centrifugou-se 30 segundos a 11000 rpm para lavar a membrana da coluna. Descartou-se o sobrenadante de forma a vazar completamente o tubo colector. Adicionou-se 500 ul do tampão RPE à coluna, centrifugou-se 30 segundos a 11000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se a etapa anterior para aumentar a eficiência.

Colocou-se a coluna num tubo colector de 1,5 ml e adicionou-se 30 ul de RNase free water directamente à membrana da coluna. Incubou-se 10 minutos para aumentar o rendimento da extracção. Centrifugou-se 1 minutos a 10000 rpm para eluir o RNA.

Armazenou-se os tubos a -80°C.

3.4.2 Qualidade e quantificação de RNA

A qualidade do RNA foi testada através do Bioanalyzer da Agilent antes de executar o microarray. Amostras são analisadas num “pseudo-gel” em bandas quantificadas. Este instrumento é muito útil pois analisa as amostras em tempo real, só necessita de 4 ul de amostra, capacidade de análise de 10 amostras em 30 minutos e os dados são apresentados de forma digital o que facilita a comparação.

A quantificação das amostras foi efectuada usando o Nanodrop 1000, onde colocamos 1 ul de amostra no aparelho e a leitura é efectuada por espectrofotometria, os resultados são extraídos directamente para o computador. O nanodrop permite alta precisão na

.....
análise das amostras, e a elevada capacidade de absorção elimina a necessidade de mais diluições.

3.4.3 Purificação do RNA

A purificação do RNA foi realizada utilizando o Kit RNeasy mini (Qiagen, Estados Unidos) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A purificação do RNA iniciou-se com o acerto do volume de amostra para 100 µl com água RNase-free, adicionou-se 350 µl do tampão RLT. Adicionou-se 250 µl de etanol 100% para diluir o RNA, e agitou-se bem com a pipeta. Transferiu-se a amostra (700 µl) para uma coluna inserida num tubo colector de 2 ml e centrifugou-se 15 segundos a 10000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µl do tampão RPE à coluna e centrifugou-se 15 segundos a 10000 rpm. Descartou-se o sobrenadante.

Adicionou-se novamente 500 µl do tampão RPE para lavar a membrana da coluna, e centrifugou-se 2 minutos a 10000 rpm.

Colocou-se a coluna num novo tubo colector de 1,5 ml, adicionou-se 30 µl de água RNase-free directamente sobre a membrana e centrifugou-se 1 minuto a 10000 rpm. As amostras foram armazenadas a -80°C.

3.4.4 Amplificação do RNA

Para cada amostra, 500 ng de RNA total foram amplificadas linearmente e marcadas com Cy3-dCTP seguindo o protocolo Agilent One-Color Microarray – Based Gene Expression Analysis.

Uma mistura de RNAs (Agilent Spike-In Mix) foi adicionada a cada amostra de RNA antes da amplificação e marcação, para monitorizar a análise do Microarray. O cRNA marcado foi purificado com o Mini Kit Qiagen RNAeasy, e mediu-se a concentração e actividade específica (pmol Cy3/ug cRNA) de cada amostra no NanoDrop ND-1000.

O cRNA marcado foi preparado para subsequente fragmentação, adicionou-se 11 ul de 10X agente bloqueante (minimiza as ligações não específicas) e 2,2 ul de 25X tampão de fragmentação, aqueceu-se a 60°C durante 30 minutos, diluiu-se com a adição de 55 ul de 2X GE (expressão génica) tampão de hibridação. O total de 100 ul de solução de

.....

hibridação foi disposta nos slides com limitação e montados com o slide do microarray (cada slide contém 4 arrays). Os slides foram incubados durante 17 horas a 65°C numa estufa Agilent Hybridization, removeu-se a câmara de hibridação, e cuidadosamente submergiu-se o slide no tampão de lavagem GE 1 para separar os slides, e lavou-se o slide do microarray no tampão de lavagem GE 1 aproximadamente 1 minuto seguindo-se uma segunda lavagem com o tampão lavagem GE 2 pré-aquecido (37°C).

Depois das lavagens, os arrays foram scanados no scanner Agilent G2565BA DNA, até atingir uma resolução de 5 um, modificou-se as definições padrão para scannar o mesmo slide duas vezes a diferentes níveis de sensibilidade (XDR Hi 100% e XDR Lo 10%). As duas imagens geradas foram analisadas em conjunto e os dados foram extraídos e os antecedentes subtraídos usando o procedimento standard contido no Agilent *Feature Extraction Software 9.5.1* (vide protocolo na integra em http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_One-Color_GE_5.7.pdf).

3.4.5 Normalização

O software de análise das imagens devolve uma série de medidas de qualidade do local para avaliar a integridade e fiabilidade da intensidade estimada no mesmo. Entre estas medidas o *Feature Extraction Software 9.5.1* flag “glsFound” (marca 1 se o local apresenta um valor de intensidade significativamente diferente do background, de outra forma marca 0) foi utilizado para filtrar as sondas com pouca fiabilidade. A partir deste passo as sondas com sinal igual a 0 não serão reconhecidas. Para tornar a análise estatística rigorosa e imparcial as sondas com uma elevada proporção de valores em falta foram removidas do sistema. Por último, os controlos de intensidade spike-in (Spike-in Viral RNAs) foram utilizados para identificar o melhor procedimento de normalização dos dados. Depois da normalização, as intensidades dos spikes devem ser uniformes ao longo de toda a experiencia para um determinado conjunto de dados.

Foi usado o software estatístico R para a análise da normalização e correlação. Por último, o teste estatístico “Statistical Analysis of Microarrays” (SAM) foi utilizado para identificar genes diferenciadamente expressos entre os diferentes grupos de douradas testados nas experiências (ver Figura 2).

3.5 Técnicas de Histologia

Neste trabalho prático realizaram-se três técnicas de histologia diferentes: coloração Hematoxilina-Eosina; distribuição histoquímica da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP); e distribuição tecidual de diversas proteínas através de anticorpos por imunohistoquímica.

A técnica de coloração Hematoxilina-Eosina foi realizada em cortes histológicos e teve como objectivo principal identificar as várias estruturas presentes nos tecidos de *S. aurata*. Esta técnica permite a identificação morfológica das células e dos tecidos, corando as estruturas básicas de cor púrpura (p.ex. células nucleares) e as estruturas ácidas de cor rosa (p.ex. citoplasma) (Junqueira et al, 1995).

O tecido recolhido na experiência descrita anteriormente foi fixado numa solução de 4% de PFA (anexo) e deixado durante a noite a 4°C, de seguida foi lavado 3 vezes durante 15 minutos cada, com tampão fosfato (PBS) e uma vez com água estéril. Reservaram-se as escamas/pele em etanol 70% a 4°C.

Posteriormente, os tecidos foram inseridos em cassetes, desidratados em etanol e embebidos em parafina utilizando um processador automático (Leica TP 1020, anexo.). Os blocos foram preparados numa consola (Miles Scientific), tendo-se utilizando parafina como material de suporte.

3.5.1 Cortes histológicos

Os cortes foram efectuados num micrótomo (Leica RM2125 RT), com uma espessura de 5 µm e colocados em lâminas limpas e previamente tratadas com APES (Sigma, anexo).

Para permitir aderência dos cortes, as lâminas foram previamente tratadas com uma solução de aminopropiltrióxido (APES) (vide anexo), foram montadas duas secções consecutivas de tecido por lâmina, que se encontravam cobertas com água destilada a 40°C de forma a permitir que o tecido se mantenha alongado e facilitar a aderência das secções. O excesso de água foi retirado e as lâminas colocadas numa estufa a 37°C para secar durante a noite.

3.5.2 Técnica de coloração – (Hematoxilina-Eosina)

Primeiro eliminou-se a parafina lavando os tecidos com xilol duas vezes, seguida de hidratação dos tecidos seleccionados, numa série de etanóis de concentração decrescente (etanol 100%, 95% e 70%) e lavagem em água destilada, cada lavagem teve a duração de 10 minutos. Os tecidos foram imergidos numa solução de hematoxilina durante 3 min e lavados com água corrente. De seguida foram imersos em eosina também durante 3 minutos, foram lavados em água destilada com algumas gotas de ácido acético e depois com água destilada. Para obter as preparações definitivas, as secções foram desidratadas, mergulhando-as em etanol (etanol 70%, 95% e 100%) e sujeitos a “clearing” com “K-clear” (Pronalab) durante 5 min, antes de serem montados com DPX (Fluka) e cobertos por uma lamela.

3.5.3 Tratamento com fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP)

As lâminas previamente montadas foram desparafinadas e hidratadas numa série decrescente de soluções de etanol a 100, 95 e 70%, sendo os tempos de 10, 5 e 5 minutos respectivamente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada durante 5 minutos. De imediato, as lâminas foram submersas na solução de pré-incubação a 20°C durante 30 minutos, sucedendo-se a solução de revelação (anexo) onde estas foram imergidas e mantidas a 20°C durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas com Mayers Hematoxilina durante aproximadamente 10 minutos. Passaram-se por água corrente para tirar o excesso de corante e depois por água destilada. Foram a secar numa estufa a 40°C e montadas de seguida com DPX.

3.5.4. IHC – Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica permite identificar, mediante o emprego de anticorpos específicos, a presença de diversos antígenos presentes no tecido. Esta técnica consiste basicamente no uso de anticorpos obtidos a partir de um animal imunizado com a substância que se pretende detectar. As secções de tecido são incubadas com o anticorpo

.....
obtido e este irá ligar-se ao antigene específico presente no tecido. Os anticorpos assim ligados especificamente podem ser visualizados através de diversas técnicas

As lâminas previamente montadas foram desparafinadas e hidratadas numa série decrescente de soluções de etanol a 100, 95 e 70%, sendo os tempos de 10, 5 e 5 minutos respectivamente. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada durante 5 minutos. Procedeu-se à inactivação através de uma solução de peroxidase endógena durante 15 minutos. As lâminas foram lavadas com tampão fosfato PBS (T) (anexo) duas vezes 3 minutos cada, seguindo-se o bloqueamento com TCT mais soro de ovelha a 4% numa câmara húmida durante 15 a 20 minutos. Este passo tem como objectivo eliminar as interações não específicas entre o anticorpo e o tecido.

Para a recuperação do epítipo mantiveram-se as lâminas em contacto com tampão citrato durante 45 segundos a elevadas temperaturas e lavaram-se imediatamente as lâminas com PBS (T).

Procedeu-se à incubação durante 1h numa câmara húmida com o primeiro anticorpo (Tabela 1). Seguiram-se várias lavagens com PBS (T). As lâminas foram incubadas durante 45 minutos com anti-Peroxidase anti-peroxidase (PAP, anti-mouse) (diluição 1:100). Efectuaram-se duas lavagens com PBS (T) durante 5 minutos e incubaram-se a lâminas com estreptavidina durante 45 minutos.

Procedeu-se às lavagens com PBS (T) duas vezes durante 5 minutos e incubaram-se a lâminas com DAB (Working Solution) durante 15 minutos. Lavaram-se as lâminas com PBS (T) durante 5 minutos.

Procedeu-se à desidratação das lâminas numa série crescente de etanol 70, 95 e 100% durante 10, 5 e 5 minutos respectivamente e de K-clear I e II duas vezes 10 minutos.

As lâminas foram montadas com DPX.

Tabela 1 – Diluição dos anticorpos utilizados na IHQ.

Anticorpos	Origem	Diluição
Anti-PCNA	GE Healthcare, Reino Unido	1:500
Anti- OSN		1:3000
Anti-ASPIC		1:3500
Anti-rabbit IgG (OSN)	GE Healthcare, Reino Unido	1:200
Anti-mouse, IgG	GE Healthcare, Reino Unido	1:100
Estreptavidina	GE Healthcare, Reino Unido	1:400