

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

**SANDRO TORRENTES DA CUNHA**

**Localização do microRNA 122 em tecido hepático  
pelo método da hibridização *in situ***

RIO DE JANEIRO  
2017

**SANDRO TORRENTES DA CUNHA**

Localização do microRNA 122 em tecido hepático pelo método da hibridização *in situ*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica.

Orientadores: Christina Maeda Takiya

Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro

2017

"Localização do MicroRNA122 em Tecido Hepático pela Técnica de Hibridização In Situ"

# SANDRO TORRENTES DA CUNHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA  
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2017.



RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)  
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



DRA. CRISTINA MAEDA TAKIYA (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



DRA. ADRIANA BASTOS CARVALHO (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR



DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTOR – UFRJ)



DRA. RAIANA ANDRADE QUINTANILHA BARBOSA (DOUTOR – UFRJ)



DRA. SILVANA ALLODI (DOUTOR – UFRJ)

## **AGRADECIMENTOS**

Falar da minha família é muito difícil, não encontro palavras para expressar o amor, carinho, respeito que sinto por vocês, minha mãe Marília, meus irmãos Lupércio e Débora e meus sobrinhos Thaianne e Rayan. Obrigado pelo apoio, carinho, compreensão e por estarem sempre ao meu lado, amo demais vocês e nada disso seria possível se não tivessem comigo. Se hoje eu estou aqui concluindo mais uma etapa na minha vida é porque tenho vocês, que são meu alicerce, minha sustentação e minha motivação. Tenho muito orgulho de todos vocês.

Como deixar de agradecer também a minha família de coração, sem eles também não estaria aqui hoje, muito obrigado Ismê e Tânia Cristina. Vocês não só abriram as portas da UFRJ para mim como acompanharam toda a minha trajetória, me socorrendo nos momentos difíceis onde o único desejo de vocês é ver o meu sucesso. Amigos assim nós não encontramos ali na esquina e podem contar comigo sempre que precisarem. Obrigado do fundo do meu coração, amo vocês.

Agradeço também ao meu grande amigo Rogério pela paciência que teve comigo nesse período, por abrir as portas da sua casa para que eu pudesse descansar e estudar tranquilo, pelos papos e apoio que me deu. Obrigado por tudo, obrigado por fazer parte da minha vida, obrigado por me aturar e acreditar em mim, você é uma pessoa muito especial e é um privilégio ser seu amigo, você mora no meu coração.

Quero agradecer também a toda família LCCM. Foi uma honra para mim poder trabalhar ao lado de pessoas tão inteligentes e competentes, porém de uma generosidade imensa. Aprendi muito nesses sete anos de convivência, não só academicamente e profissionalmente, mas também como pessoa, aprendi a superar meus medos e minhas fraquezas com o apoio de vocês. Não quero citar nomes aqui para não cometer a injustiça de esquecer alguém, então fica o meu muito obrigado aos docentes, alunos e técnicos com quem tive o prazer de conviver e desculpa se em algum momento fiz algo que possa ter desagradado alguém.

Não posso deixar de agradecer as minhas orientadoras Professora Regina e Professora Christina. Obrigado por acreditarem em mim e pela paciência comigo, pela confiança e por todo o conhecimento que me foi passado, foi muito engrandecedor para mim trabalhar com vocês e tenho muito orgulho de tê-las como orientadoras.

Obrigado!

## RESUMO

CUNHA, Sandro. **Localização do microRNA 122 em tecido hepático pelo método da hibridização *in situ***. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação de Mestrado Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Com o avanço da Biologia Molecular e a descoberta de novas moléculas, como os miRNAs, são necessárias técnicas para a detecção e investigação dessas moléculas em processos biológicos e patológicos. A Hibridização *In Situ* é a única técnica que permite uma análise histológica na detecção dos miRNAs, trazendo informações sobre os níveis e a localização dos miRNAs em células isoladas. Neste trabalho foi detectado o miRNA-122 pelo método CISH em tecido hepático humano normal, com NAFLD e com HCV, emblocados em parafina e fixados em formalina, e também em tecido hepático de camundongo normal e tratado com fenobarbital e paracetamol, emblocados em OCT e em parafina fixados em formalina. Foi realizada a coloração de H&E, para análise morfológica dos tecidos, e a coloração de picrossírius red, para análise da deposição de colágeno no parênquima do tecido, com a finalidade de diferenciar os tecidos hepáticos normais dos tecidos lesionados. Para a realização da ISH foi utilizada uma sonda enzimática LNA sintética de oligonucleotídeo conjugada a digoxigenina, sendo um método indireto de detecção em que, após a ISH, foi usado um anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina que foi revelada com NBT\_BCIP, observado posteriormente ao microscópio óptico. Foram realizados experimentos para determinar a digestão ótima da proteinase K com concentrações e tempos diferentes, a concentração ideal da sonda para o miRNA-122 e o tempo e a temperatura ideal para a realização da ISH em tecido hepático humano e de camundongo. O miRNA 122 é específico do fígado, está bem descrito na literatura e é expresso quase que exclusivamente em hepatócitos. Está envolvido em vários processos fisiológicos, onde são altamente expressos, e patológicos, tendo sua expressão reduzida, sendo possível avaliar diferentes expressões do miRNA 122. Nesta trabalho foi observado uma intensa marcação para o miRNA-122 em tecido hepático humano e de camundongo normal, e uma marcação menos intensa do miRNA-122 no tecido hepático de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol.

## ABSTRACT

CUNHA, Sandro. **Location of microRNAs 122 in hepatic tissues by In Situ Hybridization**. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação de Mestrado Profissional para Formação em Pesquisa Biomédica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

With the advancement of Molecular Biology and the discovery of new molecules, such as miRNAs, techniques are needed for the detection and investigation of these molecules in biological and pathological processes. In Situ Hybridization is the only technique that allows a histological analysis in the detection of the miRNAs, bringing information about the levels and the location of the miRNAs in isolated cells. In this study, the normal human liver tissue, NAFLD and HCV, paraffin-embedded and fixed formalin, and normal hepatic tissue of normal mouse treated with phenobarbital and paracetamol were recorded. in formalin-fixed paraffin. The H & E staining for morphological analysis of the tissues and the coloring of picosirius red for the analysis of collagen deposition in the tissue parenchyma were carried out in order to differentiate the normal hepatic tissues from the injured tissues. For the ISH, a synthetic LNA enzyme probe with digoxigenin-conjugated oligonucleotide was used. It was an indirect method of detection in which, after ISH, an alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody was used, which was revealed with NBT\_BCIP, observed later under an optical microscope. Experiments were performed to determine optimal proteinase K digestion at different concentrations and times, ideal probe concentration for miRNA-122, and the optimal time and temperature for ISH in human and mouse liver tissue. MiRNA 122 is liver specific, well described in the literature and expressed almost exclusively in hepatocytes. It is involved in several physiological processes, where they are highly expressed and pathological, and their expression is reduced and it is possible to evaluate different expressions of miRNA 122. In this work an intense marking was observed for miRNA-122 in normal and human hepatic tissue, and a less intense miRNA-122 labeling in the hepatic tissue of mice treated with phenobarbital and paracetamol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Biogênese do microRNA .....	16
Figura 2. Esquema de tecido hepático .....	20
Figura 3. H&E de tecido hepático humano .....	37
Figura 4. Picro Sírus Red de tecido hepático humano .....	38
Figura 5. MicroRNA-122 em fígado humano obtido de necrópsia.....	39
Figura 6. MicroRNA 122 em fígado humano .....	40
Figura 7. MicroRNA-122 em fígado humano obtido de biópsia .....	41
Figura 8. H&E do fígado de camundongo tratado com fenobarbital e Paracetamol .....	42
Figura 9. Picro sírus Red em tecido hepático de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol .....	43
Figura 10. MicroRNA-122 no tecido hepático de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol .....	44
Figura 11. Localização do microRNA-122 em fígado de camundongo .....	44



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de H&E .....	28
Quadro 2: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de Picro-sírius Red .....	30
Quadro 3: Desparafinização para ISH.....	31
Quadro 4: Concentração e tempo de ação da proteinase K .....	32
Quadro 5: Desidratação para ISH .....	33
Quadro 6: Diluição das sondas .....	33
Quadro 7: Concentração da sonda, tempo e temperatura de ISH .....	33
Quadro 8: Lavagem com SSC .....	34
Quadro 9: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de ISH.....	35
Quadro 10: Custos com o microRNA-122 x custos com outro microRNA.....	46
Quadro 11: Padronização da técnica de ISH .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-URT	- Região 3' não traduzida
5'-URT	- Região 5' não traduzida
AD	- Doença de Alzheimer
ALD	- Doença hepática alcoólica
CISH	- Hibridização <i>In Situ</i> cromogênica
DILI	- Lesão hepática induzida por drogas
DNA	- Ácido nucleico desoxirribose
HCC	- Carcinoma hepatocelular
HCV	- Vírus da hepatite C
H&E	- Hematoxilina e Eosina
HSC	- Células Estreladas Hepáticas
IBCCF	- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IR	- Isquemia e reperfusão
ISH	- Hibridização In Situ
LNA	- Ácido nucleico bloqueado
MEC	- Matriz extracelular
microRNA	- miRNA
mRNA	- RNA mensageiro
NAFLD	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	- Esteatohepatite não alcoólica
PBS	- Tampão fosfato-salino
PCR	- Reação em cadeia da Polimerase
qRT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	- Ácido nucleico ribose
SS	- Esteatose simples
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral Alfa
VCL	- Veia Centro Lobular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
1.1	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	11
1.1.1	Tipos de Hibridização <i>In Situ</i>	12
1.1.2	Tipos de sondas	13
1.1.3	Hibridização <i>In Situ</i> para detecção de microRNAs	14
1.2	microRNAs	16
1.2.1	Biogênese dos microRNAs	16
1.2.2	MicroRNAs e doenças humanas	18
1.2.3	microRNA 122	19
1.3	FÍGADO	19
1.3.1	Estrutura do fígado	20
1.3.2	Funções do fígado	21
1.3.3	Doenças do fígado	21
1.3.4	Doença hepática gordurosa não alcoólica	23
1.3.5	Hepatite viral	24
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
4.1	COLORAÇÃO DE H&E	28
4.2	COLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS	30
4.3	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	31
<b>5</b>	<b>RESULTADO</b>	37
5.1	H&E DE TECIDO HEPÁTICO HUMANO	37
5.2	COCLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS EM TECIDO HEPÁTICO HUMANO	38
5.3	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA O miRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO HUMANO NORMAL	39
5.4	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA O miRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO HUMANO OBTIDO DE BIÓPSIAS	40
5.5	COLORAÇÃO DE H&E EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO	42
5.6	COLORAÇÃO DE PICO SÍRIUS RED EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO	43
5.7	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA O miRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO	44
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	50
	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	53
	<b>ANEXO 1</b>	57
	<b>ANEXO 2</b>	59
	<b>ANEXO 3</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da biologia molecular e a descoberta de novas moléculas, como os microRNAs (miRNAs), se faz necessária a implementação de técnicas para a sua detecção e investigação nos processos biológicos. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para determinar os níveis de expressão dos miRNAs são a reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qRT-PCR), análise por Northern Blot e microarranjos. Porém, essas técnicas precisam lisar o tecido para extrair o RNA e fazer uma análise molecular, não sendo possível fazer uma análise histológica para detectar com precisão a expressão do miRNA em células individuais, e nem investigar a distribuição do miRNA em tecidos emblocados em parafina, faltando informações sobre essas moléculas (LI et al., 2013).

A hibridização *in situ* (ISH) é o único método que fornece informações sobre o nível e a localização dos miRNAs em células isoladas, permitindo uma análise histológica do tecido e sendo um método altamente sensível para detecção de transcritos de RNA (URBANEK; NAWROCKA; KRZYZOSIAK, 2015).

### 1.1 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

ISH é uma técnica usada para localizar e investigar ácidos nucleicos em estruturas morfológicamente preservadas, dentro de uma célula, um tecido, um núcleo ou um cromossomo. Para isso usamos sondas que são construídas com sequências de nucleotídeos complementares ao seu alvo, DNA ou RNA, podendo ser identificadas e visualizadas ao microscópio (GALL, 2016).

O objetivo da ISH é determinar a localização específica de DNA ou RNA de interesse, utilizando a propriedade de complementaridade de bases dos ácidos nucléicos tipo Watson-Crick, Citosina\Guanidina e Adenina\Timina (DNA) ou Adenina\Uracila (RNA). Este processo pode ser usado para duas vertentes complementares de DNA ou RNA e para combinações de DNA\RNA (JENSEN, 2014).

Depois das sondas marcadas se ligarem aos seus alvos, essas hibridizações podem ser visualizadas por autorradiografia quando usadas sondas isotópicas, radioativas, ou por microscopia de fluorescência e microscopia óptica quando usadas sondas não isotópicas, fluorescentes e enzimáticas, respectivamente (JENSEN, 2014).

No início, eram empregadas sondas radioativas, porém, apesar de serem muito sensíveis, o trabalho com esse material é mais complexo e exige que o manuseio, transporte e estocagem sejam feitos de acordo com regulamentação restrita. Então, mais tarde, novos métodos químicos foram desenvolvidos para conjugar as sondas a moléculas como digoxigenina, biotina e fluoresceína, por ligação covalente, surgindo assim novas vertentes para a ISH. Essas inovações fizeram com que a técnica de ISH se tornasse mais simples e rápida (SHWARTZ; ZELZER, 2014).

### 1.1.1 Tipos de Hibridização *In Situ*

- PCR *In Situ*: é um método utilizado para amplificar sequências de DNA ou RNA que têm níveis baixos de expressão, não sendo possível sua detecção pelo método de ISH padrão. Tem sido utilizado principalmente para genes humanos com uma única cópia e translocações cromossômicas. Existem muitos problemas com esta técnica, inclusive a baixa eficiência da amplificação e a baixa reprodutibilidade (JENSEN, 2014).

- Hibridização *In Situ* fluorescente (FISH): foi inicialmente usada para classificação de cromossomos e o interesse por esse método cresceu devido aos geneticistas e patologistas interessados em doenças humanas. É uma técnica eficaz, altamente sensível e que tem muitas aplicações que permitem a visualização de forma direta das alterações genéticas nas células. Suas sondas são conjugadas com fluoresceína, biotina ou digoxigenina, podendo ser detectada de forma direta, fluorocromos conjugados a sonda, ou de forma indireta, em que, após a hibridização de sondas conjugadas com enzimas, são utilizados anticorpos conjugados com fluorocromos que irão se ligar as enzimas conjugadas à sonda. Porém sua marcação não é permanente e exige microscópio de fluorescência para sua visualização (JENSEN, 2014).

- Hibridização *In Situ* cromogênica (CISH): é uma técnica que utiliza sonda enzimática, realizada pelo método indireto de detecção, tendo enzimas conjugadas a sonda, como a biotina ou a digoxigenina. Sua detecção é feita através da ligação de anticorpos, que são conjugados com peroxidase ou fosfatase alcalina, as enzimas conjugadas à sonda. Com esta técnica podem ser visualizadas as anormalidades genéticas e a morfologia do tecido, tendo um baixo custo, coloração

permanente e são amplamente utilizadas pelos patologistas por usar microscopia de luz.

### 1.1.2 Tipos de sondas

O pesquisador, ao escolher uma sonda para ISH, deve levar em consideração a sensibilidade e estabilidade da sonda, sua facilidade de penetração no tecido, a estabilidade dos híbridos, sua aplicação e se o método é reprodutível. Existem diferentes tipos de sondas que podem ser utilizadas com propriedades e opções de detecção diferentes, tais como as sondas isotópicas, ou radioativas, e as sondas não isotópicas, fluorescentes ou enzimáticas. Podem ser divididas em sondas lineares marcadas diretamente com partículas radioativas ou fluoróforos, método direto, e sondas que permitem a amplificação de sequências, método indireto. É considerado um método amplificado porque o sinal de detecção não está ligado diretamente a sonda, está ligado a um anticorpo que vai se ligar a uma enzima conjugada à sonda, ficando o sinal mais exposto tendo uma maior intensidade. (JENSEN, 2014; URBANEK; NAWROCKA; KRZYZOSIAK, 2015). As sondas podem ser compostas por:

- DNA – geradas pela reação em cadeia da polimerase (PCR);
- RNA – geradas utilizando plasmídeos contendo o cDNA do gene de interesse;
- Oligonucleotídeos sintéticos – geradas com nucleotídeos sintéticos, foram desenvolvidas para hibridizar com fragmentos menores de RNA sendo mais sensíveis e específicas que as sondas de DNA e RNA.

De acordo com a marcação que as sondas receberam elas podem ser:

- Sondas radioativas: método direto de detecção em que partículas radioativas são conjugadas à sonda, e quando hibridiza com seu alvo, pode ser observada diretamente por autorradiografia com filme de raio-x ou emulsão líquida. Foi a primeira sonda a ser usada na ISH. É considerado o método mais sensível e facilmente quantificado ou semiquantificado, usando contagem de densitometria ou por grão de prata. As desvantagens são uma resolução limitada, longo tempo de exposição em filme radiográfico, risco de exposição à radioatividade e o descarte dos resíduos radioativos (BROWN, 1998; LEVSKY; SINGER, 2003; JENSEN, 2014).

- Sondas fluorescentes: método direto e indireto de detecção. No método direto, fluoróforos são conjugados à sonda e, quando ela hibridiza com seu alvo, pode ser observada diretamente ao microscópio de fluorescência. No método indireto, enzimas são ligadas à sonda, por exemplo a digoxigenina, e quando a sonda hibridiza com seu alvo é preciso aplicar um anticorpo anti-digoxigenina conjugado a um fluoróforo, para que se possa detectar ao microscópio de fluorescência. As sondas fluorescentes têm a vantagem de serem mais seguras, baixo ruído de fundo e alta especificidade. Hoje, não se tem mais desvantagens em relação às sondas radioativas, já que sua sensibilidade aumentou bastante nos últimos anos graças ao avanço da tecnologia (LEVSKY; SINGER, 2003; JENSEN, 2014).

- Sondas enzimáticas: somente método indireto de detecção. O método será explicado com sonda conjugada a digoxigenina, pois é a mais usada atualmente e a que foi utilizada neste trabalho. Com outras enzimas o método é similar. A sonda é conjugada a digoxigenina e quando ela se liga ao alvo é preciso aplicar um anticorpo conjugado a fosfatase alcalina anti-digoxigenina, depois aplicar nitro-blue tetrazolium e 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NBT\_BCIP) que é um substrato que vai revelar a fosfatase alcalina podendo ser observada ao microscópio óptico (SILVA-VALENZUELA et al., 2006).

### 1.1.3 ISH para detecção de microRNA

A visualização espacial e temporal de transcritos de RNA no tecido é uma ferramenta chave no estudo dos processos embrionário e patológico, sendo a ISH um método altamente sensível para detecção de transcritos de RNA (SHWARTZ; ZELZER, 2014). Dentre os transcritos de RNA, são encontrados os pequenos RNAs não codificantes como os pequenos RNAs de interferência (siRNAs), os RNAs associados a PIWI (piRNAs), os miRNAs, entre outros. Os miRNAs são os mais bem investigados deste grupo, porém, sua detecção a nível celular e localização intracelular tem sido desafiadora, pois as sondas convencionais de DNA e RNA apresentam baixa afinidade e especificidade com seus alvos, devido ao pequeno tamanho dos miRNAs, ~ 22 nucleotídeos, e a similaridade das sequências entre os vários membros de uma família (URBANEK; NAWROCKA; KRZYZOSIAK 2015).

O desenvolvimento de ácido nucleico bloqueado (LNA) parece ter resolvido este problema, pois a substituição dos DNAs ou RNAs por LNAs na sonda

resulta em maior afinidade de hibridização. Os nucleotídeos de LNA são uma classe de análogos de ácido nucleico em que o anel de ribose é "bloqueado" por uma ponte de metileno ligando o átomo de 2'-O e o átomo de 4'-C. Os nucleotídeos LNA contêm as nucleobases comuns que aparecem em DNA e RNA e são capazes de formar pares de bases de acordo com as regras padrão de emparelhamento Watson-Crick. Com isso, há um aumento da estabilidade térmica do duplex LNA:RNA, o que torna possível gerar sondas de ~ 20 nt com altas temperaturas de anelamento, proporcionando a base para o elevado rigor requerido pelo miRNA. A utilização das sondas LNA:RNA melhorou significativamente a detecção de miRNAs específicos (NIELSEN, 2012).

Mesmo assim, a ISH não é uma técnica fácil de ser implantada e os motivos de falhas frequentes não podem ser atribuídos a um único processo ou reagente, mas sim a uma combinação de pré-requisitos técnicos. Por isso, os laboratórios devem ter um ambiente livre de RNase, e os técnicos devem usar luvas durante as etapas de manuseio. O protocolo da ISH contém muitos passos e em cada um deles podem ocorrer falhas. É muito importante ter bons controles positivo e negativo para estabelecer um protocolo reproduzível. Alguns passos críticos necessitam de otimização de acordo com o tipo de tecido e a sonda de detecção usada, sendo os dois passos mais críticos o da proteinase K e o da hibridização. A proteinase K faz uma digestão proteolítica baseada na clivagem de componentes do tecido por protease, que proporciona acesso aos miRNAs na matriz do tecido, e o nível ótimo de tratamento com a proteinase K é dependente do grau de fixação. A hibridização da sonda específica necessita de um meio bem definido e estável (tampão de hibridização), uma temperatura de hibridização estável e uma concentração ótima de sonda. O tampão de hibridização deve ter um nível ideal de sais, estabilizadores de oligonucleotídeos, agentes de redução de viscosidade e agentes desnaturantes.

Apesar da técnica de ISH para miRNA estar bem estabelecida, a sua implementação em um laboratório molecular ou histológico ainda é um grande desafio (NIELSEN, 2012).

Neste trabalho foi utilizada a sonda enzimática conjugada a digoxigenina, constituída de oligonucleotídeo sintético LNA para a detecção do miRNA 122 em fígados humanos com doença hepática pelo método CISH.



## 1.2 microRNAs

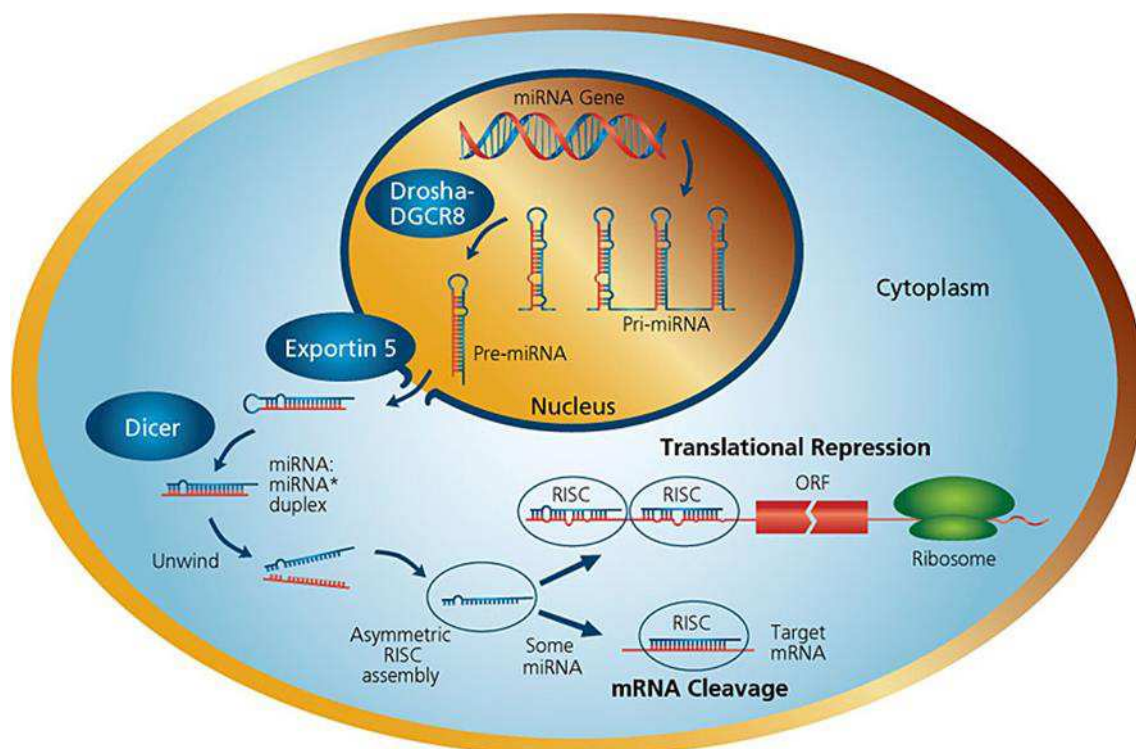
A descoberta da regulação pós-transcricional da expressão de genes por pequenos RNAs é um dos eventos marcantes no campo da Biologia Celular e Molecular moderna. Lee et al. descobriu, em 1993, que o gene Lin-4 não codificava para uma proteína, mas sim para uma pequena molécula de RNA. Mais tarde, verificou-se que essa pequena molécula de RNA se ligava a região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro (mRNA) Lin-14 por complementaridade de bases tipo Watson-Crick. Essa ligação diminuiu os níveis de proteínas Lin-14 pela repressão da tradução do mRNA Lin-14, sem que houvesse alteração nos níveis desse mRNA, sendo o RNA Lin-4 o primeiro membro conhecido da família dos microRNAs. (MAQBOOL; RUSSAIN, 2014).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNAs não codificantes que variam de 20 a 25 nucleotídeos de comprimento. Eles regulam as vias intracelulares em um nível pós-transcricional ao se ligarem à região 3'-UTR de mRNAs do gene alvo. Estes miRNAs bloqueiam a tradução ou podem causar a degradação direta dos seus mRNAs alvo. Os miRNAs não requerem uma complementaridade perfeita para o reconhecimento do alvo, de modo que um único miRNA é responsável pela regulação de múltiplos mRNAs (CHRISTOPHER et al, 2016; WANG et al, 2012; HE et al, 2012). Desde a descoberta do primeiro miRNA, há mais de 20 anos, milhares deles já foram descritos tendo funções reguladoras em processos biológicos e patológicos. Biologicamente, os miRNAs foram implicados no desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose e resposta imune (TUFEKCI; MEUWISSEN; GENÇ, 2013).

### 1.2.1 Biogênese do microRNA

Os miRNAs são sintetizados no núcleo das células e podem ser transcritos pela via canônica, ou menos frequentemente, por uma via não canônica. Na via canônica, os miRNAs são transcritos a partir de unidades transcricionais com promotores independentes que podem estar localizados nas regiões intergênicas, nos íntrons de regiões codificantes e não codificantes ou éxons. A transcrição, realizada pela enzima RNA polimerase II, origina um precursor primário denominado pri-miRNA que apresenta cap 5 e cauda poli (A) e uma estrutura secundária do tipo haste-alça ("hairpin"). O Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing cliva o pri-miRNA que resulta em um produto de ~ 70 nucleotídeos, denominado pré-

miRNA. Pela via não canônica, esses pré-miRNAs podem ser produzidos diretamente a partir de pequenas sequências intrônicas presentes em genes codificantes de proteínas sem a formação do intermediário pri-miRNA. Os pré-miRNAs são transportados, pela exportina 5, para o citoplasma onde sofrem clivagem catalisada pela Dicer, formando uma dupla fita com cerca de 20-25 pares de bases. O duplex é incorporado a um complexo multiproteico, denominado complexo de silenciamento induzido por miRNAs (miRISC), onde uma das fitas é selecionada como fita líder ao passo que, a outra fita, denominada complementar ou passageira, é removida e degradada. O miRNA inibe a expressão do gene alvo por degradação de mRNA ou repressão de tradução. A figura 1 mostra a biogênese do miRNA (WANG et al, 2012; HE et al, 2012; HÁ; KIM, 2014; SELTH; TILLEY; BUTLER, 2012).



**Figura 1 – Biogênese do miRNA.** Inicia-se canonicamente pela transcrição de um gene independente, pela RNA polimerase II, originando um pri-miRNA que é clivado pela Drosha. É exportado para o citoplasma pela Exportina 5 onde é clivado pela Dicer, formando uma dupla fita com 20-25 pb. O duplex é incorporado ao miRISC, uma das fitas é selecionada como miRNA maduro e a outra é removida e degradada. Figura retirada de: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.htm>.]

### 1.2.2 microRNAs em doenças humanas

Estudos recentes demonstraram que os miRNAs tem sua expressão alterada em várias doenças humanas, que vão do câncer à hipertrofia cardíaca. Os perfis de expressão dos miRNAs diferenciam claramente o estado normal do patológico e, portanto, seu potencial como novos biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de várias doenças humanas é imenso. Os dados emergentes sobre o papel dos miRNAs na patogênese de várias doenças humanas estabeleceram o caminho para testar sua capacidade de atuar como novas ferramentas terapêuticas. Prever as potenciais participações dos miRNAs em doenças em uma grande quantidade de dados biológicos é um grande desafio para a pesquisa biomédica (MAQBOOL; RUSSAIN, 2014; CHEM; YAN, 2014).

Diversos estudos demonstraram que muitos miRNAs estão associados à iniciação e ao desenvolvimento de vários tipos de câncer e processos relacionados eles. A alteração do perfil de expressão dos miRNAs pode levar ao desenvolvimento do câncer, em que os miRNAs têm sido parte importante no campo da oncologia molecular humana (CHEM; YAN, 2014).

No sistema cardiovascular, os miRNAs controlam as funções básicas em praticamente todos os tipos de células, como as células endoteliais, músculos cardíacos, músculo liso, células inflamatórias e fibroblastos. Portanto, a alteração no perfil expressão dos miRNAs estão diretamente envolvidos na fisiopatologia de muitas doenças cardiovasculares. (CONDORELLI, 2014).

Existem vários miRNAs associados a doença de Alzheimer (AD) e a outras doenças neurodegenerativas, entre eles o miRNA 124, miRNA 132 e miRNA 153. Os miRNAs têm um grande potencial como biomarcadores no diagnóstico, monitoramento da progressão da doença e resposta terapêutica na AD e em outras doenças neurodegenerativas. Alguns deles foram consistentemente identificados como miRNAs específicos de AD e seus objetivos também parecem implicados nos processos fisiopatológicos subjacentes à AD (FEMMINELLA; FERRARA; RENGO, 2015).

Parece que os miRNAs regulam toda a fisiologia da célula e estudos do perfil de expressão de genes demonstram alterações na expressão dos miRNAs em muitas doenças humanas, tornando-os possíveis alvos de terapias e marcadores de diagnósticos clínicos (MAQBOOL; RUSSAIN, 2014; HAMMOND, 2015).

### 1.2.3 microRNA 122

Está bem descrito que o miR-122 de vertebrados é um miRNA específico do fígado, e é expresso quase que exclusivamente em hepatócitos, podendo ter mais de 50.000 cópias por célula. O miRNA 122 corresponde a aproximadamente 70% do conteúdo total de miRNAs no fígado adulto e sua expressão é fortemente regulada durante o desenvolvimento embrionário (HU et al., 2012).

O miRNA 122 regula a tradução de um grande número de proteínas e desempenha um papel central nas funções, homeostase, diferenciação e desenvolvimento do fígado, e tem um papel importante na regulação do metabolismo do colesterol e ácidos graxos no fígado adulto (SPANIEL et al., 2013; BANDIERA et al., 2015).

O silenciamento de miR-122 levou a uma redução prolongada da esteatose hepática com diminuição das taxas de síntese de colesterol e aumentou a oxidação hepática de ácidos graxos, tornando o miR-122 um alvo potencial para o tratamento de dislipidemias (TAKAKI, 2014).

O miRNA 122 facilita a replicação do vírus da hepatite C (HCV) através da ligação do miRNA à região 5' não traduzida do vírus, e inibe a replicação do vírus da hepatite B. Em carcinoma hepatocelular (HCC), uma abordagem ao perfil de expressão genômica mostrou uma diminuição da expressão dos miRNAs 122 em tecidos não tumorais em comparação com os tecidos tumorais, nos quais houve um aumento dos miRNAs (HU et al., 2012).

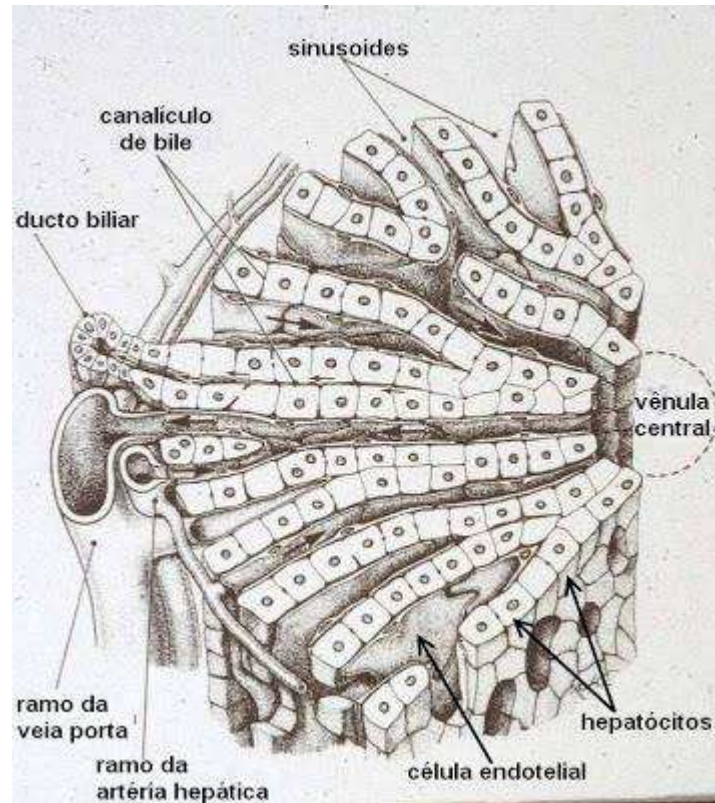
## 1.3 FÍGADO

Localizado na cavidade abdominal, o fígado é o maior órgão sólido do organismo. Estruturalmente organizado como um grupo diversificado de tecidos especializados envolvidos coletivamente em um grande número de funções bioquímicas essenciais, seu funcionamento está ligado ao sistema gastrointestinal. Tem estrutura semelhante a esponja com grande capacidade vascular, que serve como um reservatório para a regulação do sangue que flui pelo corpo (SZABO; BALA, 2014; BECDACHE et al., 2016). O fígado tem dupla circulação, proveniente da Veia-Porta e da Artéria Hepática, e devido a sua localização estratégica recebe todo o sangue proveniente do intestino, que passa pelo parênquima hepático através da circulação porta (SZABO; BALA, 2014; CHAPPLE et al., 2014).

### 1.3.1 Estrutura do fígado

O fígado é organizado em lóbulos hexagonais, onde temos, no centro, a Veia Centro Lobular (VCL) de onde os hepatócitos, principal tipo celular compreendendo cerca de 70% a 80% da massa hepática, se irradiam formando cordões anastomosados em direção à Tríade Portal, que é formada por um ramo da Veia Porta, da Artéria Hepática e do Ducto Biliar, localizadas na periferia do lóbulo (NABAVI et al., 2014; CHAPPLE et al., 2014). Entre os cordões de hepatócitos encontram-se os sinusóides, que são irrigados pela Veia Porta e Artéria Hepática levando nutrientes e oxigênio para as células hepáticas convergindo para a VCL (CHAPPLE et al., 2014).

A parede do sinusóide é revestida pelas células endoteliais com fenestrações amplas que permitem a passagem de grandes moléculas e não possuem membrana basal (SZABO; BALA, 2014). É nos sinusóides que se encontram as células de Kupffer, que são macrófagos residentes do fígado atuando como uma primeira linha de resistência contra os agentes patogênicos transmitidos pelo sangue (SICA; INVERNIZZI; MANTOVANI, 2014). Entre os hepatócitos e o endotélio sinusoidal existe uma região constituída por quantidade mínima de tecido conjuntivo frouxo, denominada Espaço de Disse, onde encontram-se as Células Estreladas Hepáticas (HSCs). No fígado saudável as HSCs funcionam principalmente na homeostase da vitamina A (DAS; BARNES; NAGY, 2014). Os ductos biliares são revestidos por um grupo especializado de células epiteliais, denominadas colangiócitos. (CHAPPLE et al., 2014). Na figura 2 temos o esquema de um lóbulo hepático.



**Figura 2 – Esquema de tecido hepático.** Placas de hepatócitos dispostas radialmente ao redor da veia central. Veia porta, artéria hepática e ducto biliar formando a tríade portal na periferia do lóbulo. Figura modificada de: Nelson Fausto; Jean S. Campbell, 2002.

### 1.3.2 Funções do fígado

O fígado é um órgão vital multifuncional com um importante papel na manutenção da homeostase do organismo. Entre as várias funções hepáticas estão a síntese de proteínas plasmáticas, produção de fatores de coagulação, produção de albumina, produção de hormônios, o processamento de glóbulos vermelhos mortos, a desintoxicação, metabolismo de glicose e lipídios, armazenamento de vitaminas e glicogênio e o processamento e a secreção da bile. Os processos de doenças que afetam essas funções geralmente são direcionados para hepatócitos, vasos sanguíneos ou canais biliares no fígado, podendo produzir um amplo espectro de doença hepática. Como o fígado tem um papel crucial na manutenção do estado da saúde, as doenças hepáticas podem afetar gravemente os indivíduos e ameaçar a vida humana (KAPLAN; KALRA; BIGGINS, 2017; NABAVI et al., 2014;).

### 1.3.3 Doenças do fígado

Vários tipos de lesão hepática, causadas pela ingestão de álcool, drogas, infecção por vírus da hepatite e obesidade resultam em fibrose podendo levar a

cirrose e a insuficiência hepática. Porém, o fígado tem um potencial de regeneração notável, e após a lesão as HSCs quiescentes são ativadas, sintetizam citocinas pró-inflamatórias, matriz extracelular (MEC) e facilitam a regeneração dos hepatócitos no fígado lesionado. Quando as lesões se tornam crônicas e persistentes, o fígado perde a sua capacidade de regeneração espontânea que resulta em um acúmulo maciço de colágeno no fígado, levando a fibrose, cirrose e insuficiência hepática (LUA; ASAHINA, 2016).

Existem três aparências morfológicas básicas do fígado lesado: necrose hepática maciça, doença hepática crônica que resulta em cirrose, e disfunção hepática sem necrose evidente (KAPLAN; KALRA; BIGGINS, 2017). Geralmente o HCC, hepatite, cirrose e esteatose hepática são os tipos mais comuns de doenças hepáticas, e entre essas, o HCC e a hepatite são os problemas de saúde pública mais prevalentes e graves (NABAVI et al., 2014).

Com o avanço da biologia molecular e a descoberta de novas moléculas, estudos mostraram que os miRNAs regulam diversas funções biológicas no fígado e que suas alterações intracelulares se correlacionam com várias doenças, incluindo hepatite viral, esteatohepatite alcoólica e não alcoólica, lesão hepática induzida por fármaco, doença hepática autoimune e lesão de isquemia-reperfusão. Também estão surgindo evidências de que os perfis de expressão de miRNAs são distintos entre doenças hepáticas com diferentes etiologias (SZABO; BALA, 2014).

O fígado é o principal local de metabolismo do álcool e por isso é um dos principais órgãos-alvo de lesão induzida pelo álcool. A doença hepática alcoólica (ALD) é caracterizada pela cicatrização do fígado pelo agente inflamatório do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que progride de fígado alcoólico gorduroso para cirrose alcoólica e carcinoma hepatocelular (MCDANIEL et al., 2014).

Estudos mostraram que o miRNA 155 teve um efeito regulatório positivo na tradução do TNF- $\alpha$  em ALD, indicando que está intimamente envolvido no desenvolvimento e progressão da lesão (MCDANIEL et al., 2014).

Como o fígado está propenso a gerar metabólitos quimicamente reativos devido a sua capacidade de biotransformação, ele está suscetível à lesão hepática induzida por drogas (DILI), que é uma doença complexa que pode ser classificada em duas subcategorias: do tipo A, que ocorre de forma previsível e dependente da dose, geralmente doses supratrapêuticas; e do tipo B, que é de natureza idiossincrática e geralmente ocorre em uma dose terapêutica.

Estudos mostraram que os miRNAs 122 e 192 podem servir de biomarcadores circulante de lesão hepática. Estudos mostraram que foi possível detectar lesão hepática mais cedo e em doses tóxicas mais baixas do que a atividade da alamina aminotransferase (ALT), quando medidas em soro (HORNBY et al., 2014).

A lesão de isquemia e reperfusão hepática (I/R) pode surgir como uma complicação da cirurgia hepática e do transplante. A indução da SIRT 1 pela inibição do miRNA 34a mediado por Monóxido de Carbono (CO) indica que pode haver uma melhora da lesão I/R hepática, podendo se tornar um alvo terapêutico para a lesão (KIM et al., 2015).

Pacientes com cirrose biliar primária (PBC) apresentaram níveis de expressão reduzidos dos miRNAs 122 e miRNA 16a, e os níveis de expressão aumentados dos miRNAs 328 e miRNA 295p. Já o papel dos miRNAs na hepatite autoimune necessita de maiores investigações.

O grande desafio para muitas doenças hepáticas é identificar tratamentos clinicamente eficazes e biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e eficácia do tratamento. O conhecimento sobre miRNA em doenças do fígado humano pode eventualmente levar a biomarcadores séricos ou teciduais com utilidade clínica e a terapias eficazes no tratamento de doenças hepáticas (RODERBURG, C; LUEDDE, T., 2014).

Por isso é importante investigar a distribuição e função dos miRNAs nas células do fígado, seu potencial na comunicação entre células e órgãos bem como sua utilidade como biomarcadores circulantes para diferentes tipos de lesões hepáticas, seja como marcadores iniciais ou de progressão das doenças do fígado (SZABO; BALA, 2013).

#### **1.3.4 Doença hepática gordurosa não alcoólica**

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é uma condição clínica que se refere a alterações histológicas potencialmente progressivas que variam de fígado gorduroso, esteatose simples (SS), a esteatohepatite não alcoólica (NASH), um estágio da doença caracterizada por lesão celular hepática, infiltrado inflamatório e fibrose variável (SALVOZA, 2014).

Na NAFLD, que é considerada um tipo de síndrome metabólica, o miRNA 122 teve seu nível de expressão sérico aumentado em 3,1 vezes na esteatohepatite



não alcoólica (NASH) em comparação com a (SS). A expressão de miR-122 no tecido hepático foi 10 vezes reduzida em NASH em comparação com SS e foi preferencialmente expressa na borda de hepatócitos carregados de lipídeos (PIROLA et al., 2015).

Embora haja muita pesquisa a ser conduzida para decifrar os mecanismos associados à progressão da NAFLD, muitas questões permanecem sem solução. Por exemplo, ainda há poucas informações sobre o papel dos miRNAs na biologia da doença, e não existe um biomarcador não invasivo confiável para distinguir os estágios histológicos, leve ou grave, da doença (SALVOZA, 2014).

### 1.3.5 Hepatite C viral

O HCV é um importante patógeno humano que infecta até 185 milhões de pessoas em todo o mundo, causando doença hepática e carcinoma hepatocelular em fase terminal. Possui um genoma de RNA monocatenóide de sentido positivo e sua região 5'UTR serve como uma plataforma para o recrutamento de fatores celulares que são essenciais para a tradução e/ou replicação viral do RNA, incluindo o miRNA 122 (MASAKI *et al.*, 2014).

Estudos mostraram que a ausência do miRNA 122 diminui significativamente a replicação do RNA viral, em que experimentos com células mostraram que o silenciamento do miR-122 com antagomir diminui a abundância do RNA do HCV, enquanto a transfecção de “imitadores” (*mimics*) de miR-122 aumenta o nível do HCV, sugerindo que o miRNA 122 facilita a replicação do RNA viral através da interação com a 5'UTR viral (HU, 2012).

Um oligonucleotídeo de LNA anti-senso de 15 nt de comprimento (miravirsen), complementar e de alta afinidade e especificidade para a região 5' do miRNA 122 foi administrado em chimpanzês com infecção crônica por HCV, no qual proporcionou uma supressão viral duradoura sem evidências de mutações resistentes nos locais de ligação do miRNA 122, e não foram observados eventos adversos em estudo de fase 1 em pacientes saudáveis (JANSSEN et al., 2013).

Já em um estudo de fase 2 multicêntrico, em que foi administrado miravirsen, observou-se uma ampla variabilidade nas respostas dos pacientes, sugerindo que fatores hospedeiros e/ou virais podem influenciar na resposta do tratamento. Não se sabe quantas cópias do miR-122 são necessárias para a replicação do HCV e se o miravirsen é capaz de sequestrar todo o miRNA-122

hepático. Além disso, é desconhecido quanto tempo a inibição do miRNA-122 é preservada após a administração de miravirsen, e o efeito direto ou indireto que a inibição do miRNA-122 pode causar ao nível de expressão de outros miRNAs (REE et al., 2016).

Por isso, mais estudos são necessários para entender o papel regulador do miR-122 em vários estágios da infecção por HCV e seu uso como molécula direcionada para o desenvolvimento de novas terapias para hepatite C (HU, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

No Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), a principal técnica utilizada para a detecção dos miRNAs é o qRT-PCR. Porém, a ISH é o único método que fornece informações sobre a localização dos miRNAs a nível celular, sendo uma ferramenta útil e confiável para investigar a expressão e distribuição de um miRNA (URBANEK; NAWROCKA; KRZYZOSIAK, 2015; LI et al, 2013).

Este trabalho visa implementar a técnica de ISH no IBCCF para uma melhor compreensão dos miRNAs e para poder auxiliar nos trabalhos de pesquisa do Instituto, podendo levar a diagnósticos, prognósticos e a terapias eficazes.

Para isto foi utilizado tecido hepático normal e com lesão para detecção do miRNA122, que já está bem descrito na literatura, e tem níveis de expressão diferentes dependendo do grau de lesão do fígado. Assim, com o mesmo miRNA, pode ser feita a detecção em níveis diferentes de expressão, reduzindo os custos e validando a técnica de ISH.

### 3 OBJETIVO

- Implementar a técnica de hibridização *in situ* no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, por meio da localização do microRNA 122 no tecido hepático.

➤ OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a presença de lesões nas amostras dos tecidos hepáticos através das colorações de Hematoxilina e Eosina e picrosírius Red:

- Detectar miR-122 em tecidos hepáticos saudáveis e não saudáveis humanos pela técnica de Hibridização *In Situ*;

- Detectar o miR-122 em tecido hepático de camundongos tratados com Fenobarbital e paracetamol pela técnica de Hibridização *In Situ*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), parecer número: **1.396.975**

Para a realização deste trabalho foram utilizados 14 blocos de tecido hepático humano, sendo 11 blocos provenientes de biópsias em que 5 blocos são de pacientes com esteatose, 6 blocos de pacientes com infecção viral e 3 blocos de tecido hepático humano proveniente de necropsia em que a causa do óbito não teve origem hepática, considerados neste trabalho como tecido hepático normal.

Os 11 blocos provenientes de biópsias foram pré-fixados com Bouin por 2 horas, depois fixados em formalina 10% tamponada e emblocados em parafina. Os três blocos provenientes de necropsia foram fixados em formalina 10% tamponada e emblocados em parafina. Estes materiais foram cedidos pelo Setor de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, mantido o anonimato.

Foram utilizados 9 blocos de parafina e 9 blocos de OCT de tecido hepático de camundongos C57BL/6 tratados com fenobarbital e paracetamol. Para emblocar em parafina, os tecidos foram fixados em formalina 10% tamponada, processados e desidratados, e para emblocar em OCT, foram utilizados tecidos frescos, sem fixação, assim que foram extraídos dos animais, e congelados à -80°C. Estes materiais foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde sob o número: **162\13**.

### 4.1 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

Os tecidos emblocados em parafina foram seccionados a uma espessura de 4 µm em um micrótomo Leica modelo RM 2125, levados ao banho-maria com água destilada a uma temperatura aproximada de 45°C e coletados com lâminas foscas para microscopia.

As lâminas foram levadas a estufa por 30 minutos a 60°C para derreter a parafina, o que facilita a desparafinização. Depois passaram por uma bateria de três

xilenos por 10 minutos cada, que tem por objetivo remover toda a parafina dos tecidos.

Após o xilol III, as lâminas passaram por uma bateria de hidratação (álcool I – 100%; álcool II – 90%; álcool III – 80% e álcool IV – 70%) por 5 minutos cada, foram lavadas em água corrente e depois em água destilada, hidratando os cortes para a coloração.

As lâminas foram incubadas por 8 minutos com hematoxilina (que deve ser filtrada toda vez antes de ser usada e tem por objetivo corar os núcleos das células em roxo), lavadas em água corrente por 2 minutos, mergulhadas rapidamente em uma solução de álcool clorídrico a 1% (que tem a finalidade de remover o excesso da hematoxilina), lavadas em água corrente por 5 minutos, ou até azular, e lavadas em água destilada.

Em seguida, as lâminas foram mergulhadas no corante Eosina\Floxina B por 3 minutos (com a finalidade de corar o citoplasma das células em rosa), lavadas em água corrente, depois em água destilada e passaram pela bateria de desidratação (álcool I – 70%; álcool II – 90%; álcool III – 100% e álcool IV – 100%), que tem o objetivo de retirar a água do tecido para receber o meio de montagem. Após a desidratação os tecidos foram diafanizados, passando por uma bateria de três xilenos com o objetivo de clarear, remover o álcool e impregnar os tecidos com xilol. As lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas. No Quadro 1 temos a descrição dos reagentes utilizados na técnica de H&E.

**QUADRO 1: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de H&E**

REAGENTES	MARCA	CATÁLOGO
Álcool Etílico	VETEC	V001495
Xileno	VETEC	V000142
Ácido Clorídrico	VETEC	154
Hematoxilina	VETEC	75290
Eosina	Sigma	E4382
Floxina B	VETEC	45410
Lâminas foscas	Olen	K5 7105.1
Lamínulas	Deckglases	-----
Entellan	MERCK	HX56176261

## 4.2 COLORAÇÃO DE Picro SIRIUS RED

Os tecidos emblocados em parafina foram seccionados a uma espessura de 6  $\mu\text{m}$  em um micrótomo Leica modelo RM 2125, levados ao banho-maria com água destilada a uma temperatura aproximada de 45°C e coletados com lâminas foscas para microscopia.

As lâminas foram levadas a estufa por 30 minutos a 60°C para derreter a parafina, o que facilita a desparafinização. Passaram por uma bateria de três xilenos por 10 minutos cada, que tem por objetivo remover toda a parafina dos tecidos.

Após o xilol III, as lâminas passaram por uma bateria de hidratação (álcool I – 100 %; álcool II – 90%; álcool III – 80% e álcool IV – 70%) por 5 minutos cada, foram lavadas em água corrente e depois em água destilada, hidratando os cortes para a coloração.

Depois as lâminas foram para um banho de Ácido Fosfomolibdico 0,1% por 1 minuto e em seguida para a solução de Picro sirius Red por 90 minutos, protegido da luz.

Foram para um banho de Ácido Clorídrico 0,01 N e lavadas em água corrente, em água destilada e passaram pela bateria de desidratação (álcool I – 70%; álcool II – 90%; álcool III – 100% e álcool IV – 100%), que tem o objetivo de retirar a água do tecido para receber o meio de montagem. Após a desidratação os tecidos foram diafanizados, passando por uma bateria de três xilenos (xilol I; II e III), com o objetivo de clarear, remover o álcool e impregnar os tecidos com xilol, sendo as lâminas montadas com Entellan e lamínulas. No quadro 2 temos os reagentes utilizados na técnica de coloração de Picro Sírius Red.

**QUADRO 2: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de Picro-sírius Red**

REAGENTE	MARCA	CATALOGO
Álcool Etílico	VETEC	V001495
Ácido Clorídrico	VETEC	154
Ácido Fosfomolibdico	VETEC	443
Direct Red	Sigma	365548
Entellan	Merck	HX56176261
Lâmias foscas	Olen	K5 7105.1
Lamínulas	Couver Glass	-----
Xileno	VETEC	V000142

### 4.3 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Para a implementação da técnica de Hibridização *In Situ*, vários desafios tiveram que ser superados, principalmente por se tratar de uma técnica em que os alvos, os miRNAs, são moléculas muito instáveis e facilmente degradáveis. Por isso, é necessária uma área de trabalho, equipamentos e soluções livres de RNases (SILVA-VALENZUELA et al., 2006). É uma técnica de difícil implementação porque envolve vários passos críticos, como a digestão pela proteinase K, a determinação da concentração da sonda, a temperatura adequada de hibridização e lavagem eficiente.

Neste trabalho foi utilizado o Kit miRCURY LNA™ microRNA ISH *Optimization Kit* (FFPE), 9003 da EXIQON. O protocolo ISH microRNA tem duração de um dia e vem com as sondas microRNA scrambled LNA™, que é o controle negativo, sondas microRNA 122 LNA™, proteinase K e tampão de ISH 2x.

A otimização dos procedimentos da ISH foi dividida em três passos:

1. Tratamento com a proteinase K para determinar a concentração e o tempo de digestão para o tecido de interesse.
2. Padronizar a temperatura de hibridização para o miRNA-122 a ser localizado.
3. Ajustar a concentração da sonda e as lavagens pós-hibridização para reduzir o background.

Para a secção dos tecidos em parafina foi utilizado o micrótomo Leica modelo RM 2125, e para os tecidos congelados em OCT foi utilizado o criostato Leica modelo CM 1850. Estes equipamentos bem como as pinças, os pincéis e



todos os outros materiais utilizados na técnica de microtomia foram limpos com RNase Zap. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q livre de RNase, com vidrarias limpas e autoclavadas e todos os materiais auxiliares utilizados neste processo também foram limpos com RNase Zap. Além disso, o operador trabalhou com luvas e máscara. Os tecidos em parafina foram seccionados a 5  $\mu\text{m}$ , estendidos em um banho-maria com água Milli-Q autoclavada, coletados com lâminas novas tratadas com silano e secos em temperatura ambiente por 2 horas, sendo armazenadas à 4°C. Os tecidos emblocados em OCT foram seccionados a 5  $\mu\text{m}$ , aderidos a lâminas novas silanizadas, fixadas em formalina 10% tamponada e armazenadas a -20°C.

As cubas de vidro, pinças, provetas e lamínulas de vidros, utilizados nos passos da ISH foram limpas com RNase Zap e esterilizadas em uma estufa com temperatura a 180°C por oito horas.

Um dia antes de iniciar a ISH, as lâminas com tecidos em parafina foram retiradas do freezer e levadas a estufa por 45 minutos para derreter a parafina, sendo armazenadas novamente a 4°C para ser utilizada no dia seguinte, iniciando a hibridização *In Situ*.

No anexo 1 temos os reagentes que precisam ser preparados antes do dia da ISH, e no anexo 2 temos os reagentes que precisam ser preparados no dia.

Passo 1: As lâminas, parafina e OCT foram colocadas em uma cesta porta lâminas em uma bancada até atingir a temperatura ambiente, por aproximadamente meia hora. As lâminas em parafina foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol, conforme quadro 3.

**QUADRO 3: Desparafinização para ISH**

PASSOS	SOLVENTES	TEMPO
1	Xilol	5 minutos
2	Xilol	5 minutos
3	Xilol	5 minutos
4	Etanol 100%	5 minutos
5	Etanol 96%	5 minutos
6	Etanol 70%	5 minutos
7	PBS	2 – 5 minutos

As lâminas em OCT passaram por dois banhos de 5 minutos cada em água livre de RNase e dois banhos de PBS de 5 minutos. Os próximos passos foram comuns aos tecidos de parafina e OCT.

Passo 2: Incubar com proteinase K a 37°C. Imediatamente antes do uso, a proteinase foi diluída em tampão de proteinase K (preparado conforme a quadro 4). Para determinar o tempo e a concentração ideal para a digestão da Proteinase K, nós utilizamos concentrações e tempos diferentes como mostra o quadro 4.

**QUADRO 4: Concentração e tempo de ação da proteinase K**

<b>FÍGADO HUMANO</b>			
<b>Concentração varia\tempo igual</b>			
PROTEINASE K 20 µg/mL	TAMPÃO PROTEINASE K	CONCENTRAÇÃO FINAL	TEMPO\MINUTOS
5 µl	10 mL	10 µg/mL	10
7,5 µl	10 mL	15 µg/mL	10
10 µl	10 mL	20 µg/mL	10
<b>Concentração igual\tempo varia</b>			
PROTEINASE K 20 µg/mL	TAMPÃO PROTEINASE K	CONCENTRAÇÃO FINAL	TEMPO\MINUTOS
7,5 µl	10 mL	15 µg/mL	5
7,5 µl	10 mL	15 µg/mL	10
7,5 µl	10 mL	15 µg/mL	15
<b>FÍGADO CAMUNDONGO</b>			
<b>Concentração varia\tempo igual</b>			
PROTEINASE K 20 µg/mL	TAMPÃO PROTEINASE K	CONCENTRAÇÃO FINAL	TEMPO\MINUTOS
0,5 µl	10 mL	1 µg/mL	10
1 µl	10 mL	2 µg/mL	10
1,5 µl	10 mL	3 µg/mL	10
<b>Concentração igual\tempo varia</b>			
PROTEINASE K 20 µg/mL	TAMPÃO PROTEINASE K	CONCENTRAÇÃO FINAL	TEMPO\MINUTOS
1 µl	10 mL	2µg/mL	5
1 µl	10 mL	2 µg/mL	10
1 µl	10 mL	2 µg/mL	15

Passo 3: Lavar as lâminas duas vezes em PBS.

Passo 4: Desidratar as lâminas em etanol crescente conforme o quadro 5.

**QUADRO 5: Desidratação para a hibridização**

PASSOS	SOLVENTES	TEMPO
1	Etanol 70%	1 minuto
2	Etanol 96%	1 minuto
3	Etanol 100%	1 minuto

Passo 5: Hibridização. As lâminas secaram sobre um papel toalha limpo por 15 minutos, a sonda microRNA 122 LNA<sup>TM</sup> e a sonda microRNA scrambled LNA<sup>TM</sup> (controle negativo) foram colocadas separadamente em eppendorf livre de RNase. Estas sondas foram desnaturadas em banho-maria a 90°C por 4 minutos, e em seguida foi adicionado a cada eppendorf o tampão ISH microRNA 1x, fornecido pelo kit, para diluir as sondas em concentrações de acordo com a tabela 6.

**QUADRO 6: Diluição das sondas.**

SONDAS	TAMPÃO ISH 1X	CONCENTRAÇÃO FINAL
3,2 µL	2 mL	40 nM
1,6 µL	2mL	20 nM
0,8 µL	2mL	10 nM

Com uma pipeta, foram adicionados 25 µL das sondas 122 LNA<sup>TM</sup> sobre os cortes e, nos controles negativos, foram adicionados 25 µL das sondas *scramble* LNA<sup>TM</sup>. Foi aplicada uma lamínula de vidro estéril sobre os cortes e vedada com Fixogum. As lâminas foram colocadas em uma câmara umidificada com SSC 5x e mantidas na estufa, por 1 hora ou overnight, como mostra a o quadro 7.

**Quadro 7: concentração da sonda, tempo e temperatura da ISH**

TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO °C	TEMPO DE HIBRIDIZAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DA SONDA nM
50	1 Hora e <i>overnight</i>	40, 20, 10
52	1 Hora e <i>overnight</i>	40, 20, 10
54	1 Hora e <i>overnight</i>	40, 20, 10
56	1 Hora e <i>overnight</i>	40, 20, 10
58	1 Hora e <i>overnight</i>	40, 20, 10

Passo 6: O Fixogum foi removido com o auxílio de uma pinça e as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo SSC 5x.

Passo 7: As lâminas foram lavadas em tampão SSC em temperatura da hibridização, conforme o quadro 8.

**QUADRO 8: Lavagem com SSC**

PASSOS	TAMPÃO	DURAÇÃO	TEMPERATURA
1	SSC 5x	5 minutos	Temperatura de hibridização
2	SSC 1x	5 minutos	Temperatura de hibridização
3	SSC 1x	5 minutos	Temperatura de hibridização
4	SSC 0,2x	5 minutos	Temperatura de hibridização
5	SSC 0,2x	5 minutos	Temperatura de hibridização
6	SSC 0,2x	5 minutos	Temperatura ambiente

Passo 8: As lâminas foram transferidas para uma cuba de vidro com PBS e foi aplicada uma barreira hidrofóbica, caneta DAKO, em volta dos tecidos. Os cortes dos tecidos não podem secar durante os próximos passos.

Passo 9: As lâminas foram Incubadas com solução bloqueadora por 15 minutos. Para fazer a solução bloqueadora e a solução diluente de anticorpo, foram adicionados 300 µL de soro de ovelha em 15 mL de PBS-T identificada como solução de bloqueio, retiramos 5 µL e reservamos em um *ependorf* identificando como solução diluente. Na solução bloqueadora, adicionamos 330 µL de BSA 30% ficando pronta para o uso e, na solução diluente, adicionamos 5 µL de PBS e 330 µL de BSA 30% ficando pronta para o uso. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e adicionamos 40 µL da solução bloqueadora em cada corte por 10 minutos.

Passo 10: Foi aplicado o anticorpo anti-DIG por 60 minutos. A solução bloqueadora foi removida e aplicado 40 µL de Anti-DIG-AP a 1:800 em solução diluente de anticorpo por 60 minutos em temperatura ambiente.

Passo 11: As lâminas foram lavadas em PBS-T 3 vezes por 3 minutos.

Passo 12: Foram incubar com substrato AP por 2 horas a 30°C. Para preparar o substrato AP, foi adicionado 200 µL de NBT-BCIP a 10 mL do tampão de detecção, 0,1 m de Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M de NaCl, e adicionado 20 µL de levamisole.

Passo 13: As lâminas foram incubadas em tampão KTBT (preparado de acordo com o quadro 3) 2 vezes por 5 minutos. Essa lavagem para interromper a reação.

Passo 14: Foram lavar com água Milli-Q autoclavada 2 vezes por 1 minuto.

Passo 15: Foi aplicado 200 µL de Nuclear Fast Red por 1 minuto.

Passo 16: As lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos, mexendo bem e trocando a água.

Passo 17: As lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories). No quadro 9, temos a descrição dos reagentes utilizados na técnica de ISH.

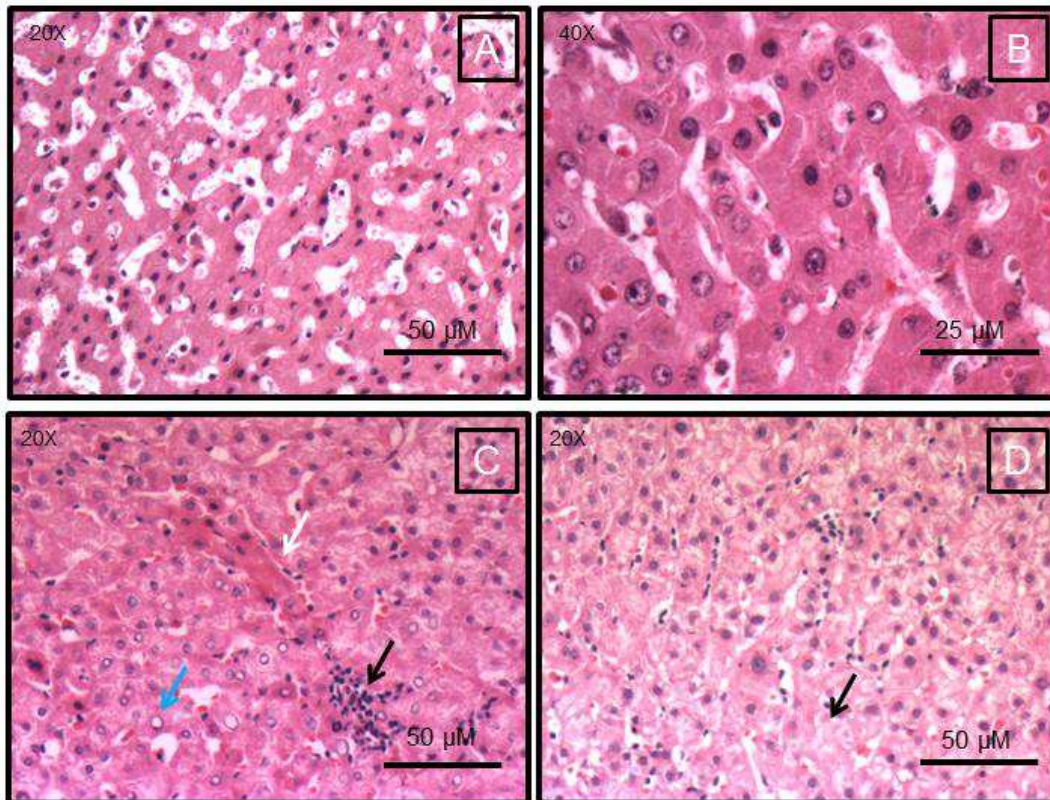
**QUADRO 9: Descrição dos reagentes utilizados na técnica de ISH**

REAGENTE	MARCA	CATALOGO
Álcool Etílico	VETEC	V001495
Anti-DIG-AP	Roche	11 093 274 910
BSA 30%	Sigma	A9576
EDTA 0.5 M	Sigma	03690
Fixogum	MP Biomedicals	11FIXO0050
KCl	Sigma	P9541
Kit de otimização ISH	EXIQON	9003
Lamínulas 22x22mm	Couver Glass	-----
Lâminas silanizadas	Inopal	HDAS003
Levamisole	Fluka	31742
NaCl 5M	Sigma	53014
NBT\BCIP	Roche	11 697 471 001
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories	H-3403
PBS	LGC Biotecnologia	13-30258
RNase Zap	Ambion	AM9780
Rubber Cement, Fixogum	MP Biomedicals	11FLOX0050
Sheep sérum	Jackson Immunoresearch	013.000.121
Tween-20	Sigma	P1379
Xileno	VETEC	V000142

## 5 RESULTADOS

### 5.1 H&E DE TECIDO HEPÁTICO HUMANO

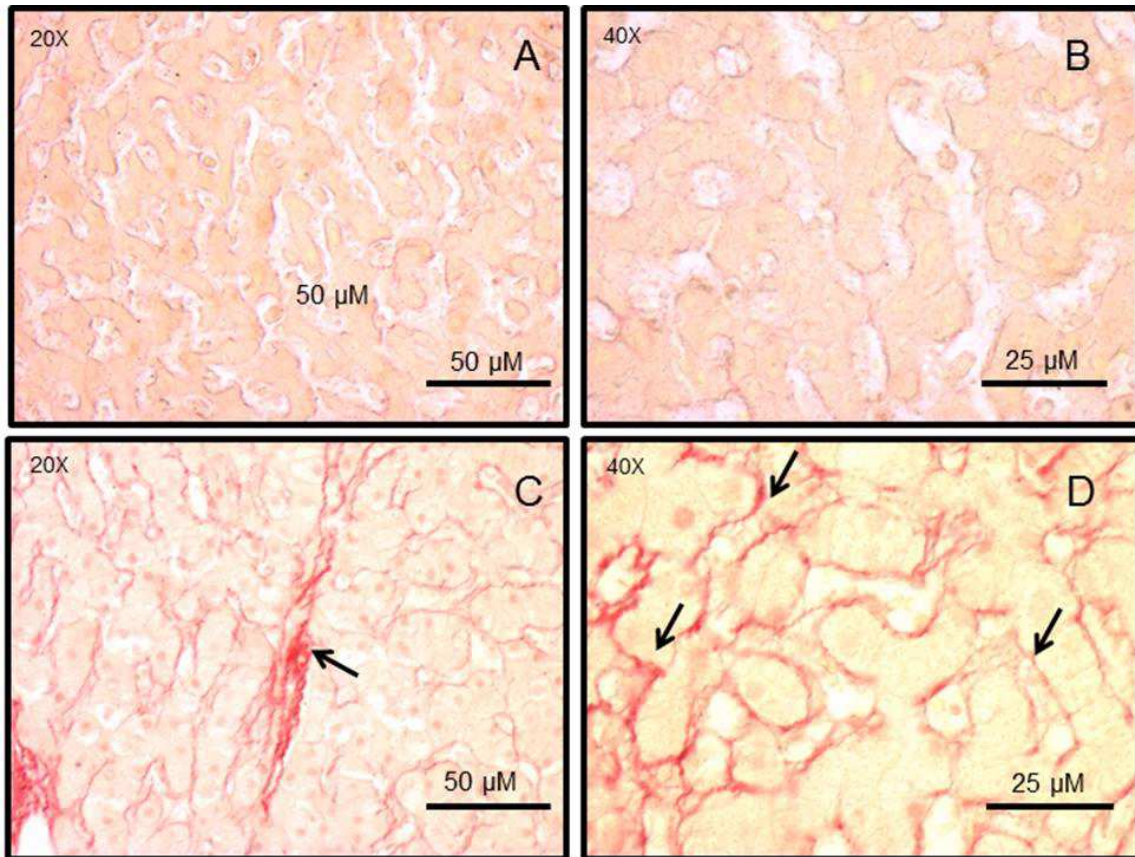
A coloração de H&E, em que a hematoxilina cora o núcleo da célula em roxo e a eosina cora o citoplasma de rosa, foi realizada para observar a morfologia do tecido e, dessa forma, foi feita a seleção dos tecidos lesados e normais, com diferentes níveis de expressão de miRNAs. Nos tecidos hepáticos normais, os miRNAs são expressos em abundância, já nos tecidos com algum grau de lesão a expressão é significativamente reduzida, sendo possível observar a diferença nas marcações pela hibridização. Nos tecidos de necropsia de tecido humano, foi observado ausência de sinais que pudessem indicar lesões no fígado, considerados fígados normais. Nos fígados de biópsia de tecido humano, foi possível observar algumas alterações que indicaram a presença de lesão no tecido hepático, como áreas com infiltrado inflamatório no parênquima do tecido, que são áreas com células inflamatórias, como os linfócitos, concentradas em um ponto. Foram observadas também áreas de provável necrose, que são as áreas com um tom de rosa mais forte, avermelhado. Foram encontradas células com inserções lipídicas em seu núcleo e algumas áreas com células com citoplasma tumefeito, como mostrado na Figura 3.



**Figura 3. Microscopia óptica representando tecidos hepáticos humanos saudáveis e não saudáveis corados com H&E.** Nas figuras A e B, fígados de necropsia, podemos observar que os tecidos apresentam um aspecto normal, sem indícios de lesão. Na figura C, fígados de biópsia, nós observamos áreas de infiltrado inflamatório (seta preta), uma provável área de necrose (seta branca) e vacúolos lipídicos nos núcleos das células (seta azul). Na figura D, fígado de biópsia, observamos áreas com células tumefeitas (seta preta).

## 5.2 COLORAÇÃO DE PICRO SÍRIUS RED

Nesta técnica, as fibras colágenas são coradas em vermelho e o tecido viável corado em amarelo, podendo ser observado ao microscópio de luz e quantificado. Nos tecidos humanos de necropsia corados com picro sirius red, não foram observadas alterações na deposição de colágeno no parênquima tecidual, indicando que estes tecidos não sofreram lesões. Nos tecidos humanos de biópsia, por outro lado, foram identificadas áreas com fibrose e um aumento na deposição de colágeno no tecido, indicando um grau de lesão hepática, como mostra a Figura 4.



**Figura 4. Microscopia óptica representando tecidos hepáticos humanos saudáveis e não saudáveis corados com picro sírius red.** Nas figuras A e B, tecido obtido de necropsia, não foi observado aumento de colágeno no parênquima do tecido. Na figura C e D, tecido de biópsia, observamos áreas com maior deposição de colágeno no parênquima do tecido (setas pretas).

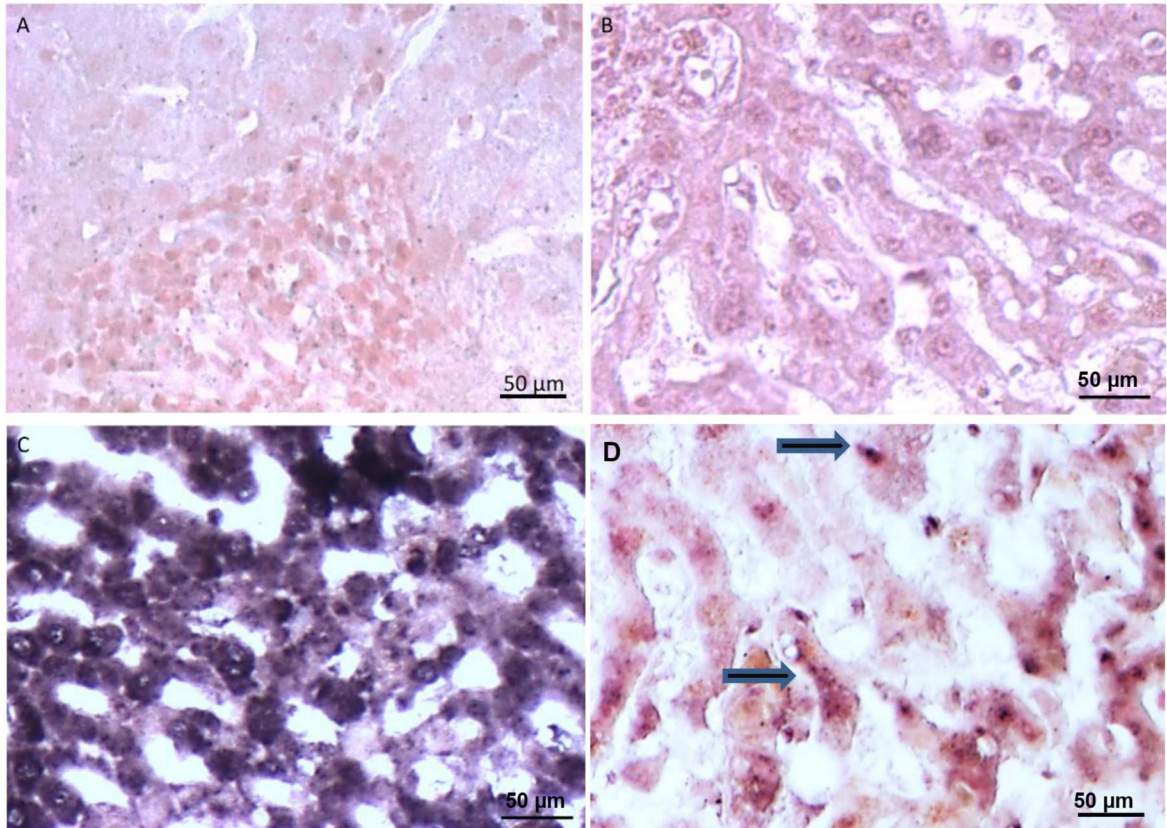
### 5.3 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA O MIRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO HUMANO NORMAL

Neste trabalho, foi realizado o ensaio de hibridização *in situ* para o miRNA 122 no tecido hepático obtido em necropsia, de paciente sem evidencia clínica de doença hepática, considerados como tecido hepático humano normal.. A análise histopatológica do material evidenciou uma discreta congestão do fígado e ausência de lesão hepática específica.

A hibridização *in situ* para o microRNA 122 evidenciou, nas áreas aparentemente normais, presença de reatividade forte para o marcador. Foi verificado também que alguns hepatócitos exibiam ausência ou diminuição da marcação específica, provavelmente por se tratar de tecido de necropsia, pois mesmo não havendo indícios de lesão, há uma demora entre o óbito e a fixação do tecido, podendo levar a degradação de mol. O corte de fígado incubado com o controle *scrambled* se mostrou negativo para a marcação do miRNA 122,

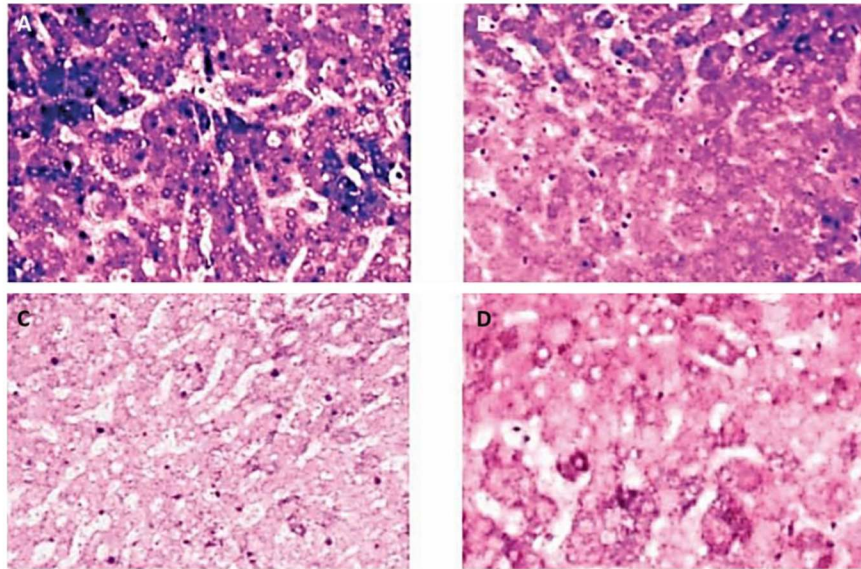


semelhante ao corte histológico incubado somente com o diluente das sondas (Figuras 5A, B, C e D).



**Figura 5. Identificação do miRNA-122 em fígado humano obtido em necrópsia por Hibridização In Situ.** (A) Controle negativo de corte histológico humano. Corte histológico incubado somente com o diluente das sondas. (B) Controle negativo. Corte histológico de fígado incubado com o controle negativo *scramble*. Não há presença de marcação específica. (C) Área do fígado humano exibindo traves hepatocitárias com reatividade forte ao microRNA 122. (D) Região do fígado humano com leve reatividade ao microRNA 122 em alguns hepatócitos (seta). Os cortes histológicos foram incubados com a sonda LNA™-digoxigenina para o microRNA-122 ou com a sonda sonda LNA™\_scrambled (controle negativo) ou com o diluente das sondas (controle negativo) e detectadas com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina. Utilizou-se o substrato cromógeno nitroblue tetrazolio/5 bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP). Contracoloração: *Fast Red*. Barra de calibração: 50 µm.

O padrão de marcação obtido foi semelhante ao visto anteriormente em outros estudos, como pode ser visto na Figura 6, onde foram reproduzidas as marcações obtidas por Wang e colaboradores (2012), para o microRNA-122, em fígado humano.



**Figura 6. Identificação do miRNA-122 em fígado humano por Hibridização *In Situ*.** O microRNA-122 foi detectado em biopsias de fígado de controles normais (A), pacientes com hepatite B crônica (B), pacientes com hepatite B crônica grave (C) e corte histológico incubado com o controle negativo (scrambled). Reproduzido de Wang et al., 2012.

Como já foi dito anteriormente, a técnica de hibridização *In Situ* tem alguns passos cruciais para que a técnica possa ser bem sucedida.

Não foi possível conseguir uma sala e nem equipamentos exclusivos para a técnica de ISH, mas foi possível separar um espaço na bancada para trabalhar livre de RNases, dividir alguns equipamentos com técnicas que trabalham livre RNase, como PCR, e adaptar alguns equipamentos, como utilizar uma estufa e câmaras úmidas na falta de um Hibridizador. É muito importante o cuidado para evitar a contaminação com RNase durante os passos da hibridização e no preparo das soluções. Foi observado neste trabalho que uma provável contaminação nas cubas usadas nos passos da hibridização inibiram marcações para o miRNA 122, pois as cubas eram limpas com RNase Zap mas não eram esterilizadas à 180°C, como recomendado. As cubas passaram então a ser esterilizadas e começamos a obter resultados nos nossos experimentos.

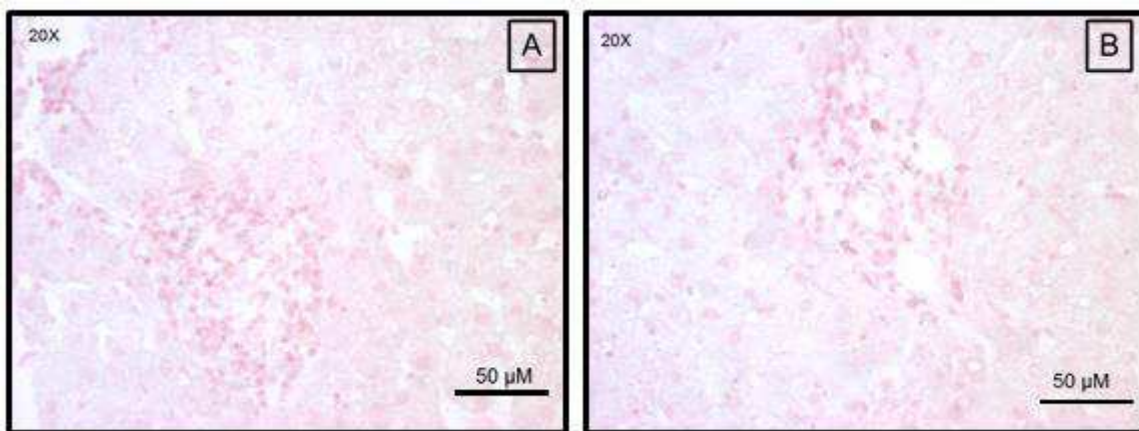
Nos experimentos realizados para saber qual a concentração ideal e tempo necessário para a realização da digestão enzimática eficiente pela proteinase K, foi obtido resultado com 15 µg/mL por 10 minutos em tecidos hepáticos humanos, não obtendo resultado nas outras concentrações da proteinase K.

Em relação a concentração da sonda, só se observou marcação a 40 nM com o tempo de hibridização de 12 horas (overnight) à 52°C. No protocolo de hibridização por 1 hora, não foi observada marcação com nenhuma outra

concentração das sondas. As lavagens pós-hibridização foram bem sucedidas, feitas a temperatura de hibridização, não sendo observado ruído de fundo nos controles negativos, realizados com um mix de sondas, *scramble*, ou apenas com tampão de diluição de sonda.

#### 5.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA O MIRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO HUMANO COM LESÃO

Em biópsias de tecidos humanos era esperado encontrar pouca marcação, pois o microRNA-122 tem seus níveis de expressão diminuídos em tecidos com lesão. Porém, não foi observada marcação (Figuras 7A, B). Talvez o motivo pudesse ser a fixação do tecido e foi averiguada a procedência dos blocos. Esses blocos tinham sido fixados com fixador de bouin, que é um fixador não apropriado para este tipo de técnica pois ele destrói rapidamente os ácidos nucleicos, indicando que a ausência de marcação possa ser devido a uma questão técnica.



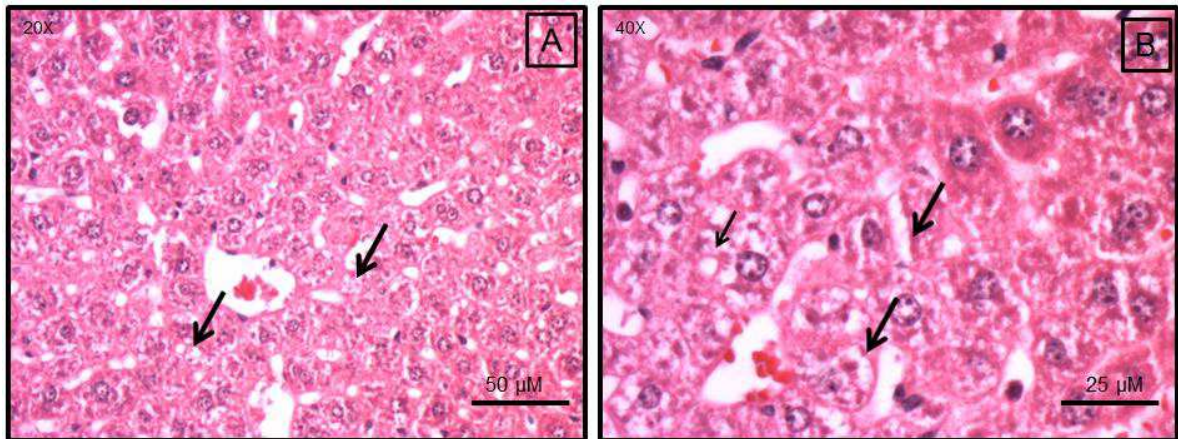
**Figura 7. Identificação do miRNA-122 em fígado humano com lesão por Hibridização *In Situ*.** (A) e (B). Cortes histológicos de fígado humano com quadro histológico de hepatite crônica, hibridizados com a sonda LNA<sup>TM</sup>-digoxigenina para o microRNA-122 e detectadas com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina. O substrato cromógeno *nitroblue* tetrazolio/5 bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) foi utilizado. Contracoloração: *Fast Red*. Barra de calibração: 50 μm. Ausência de reatividade para o microRNA 122 em (A) e (B).

#### 5.5 COLORAÇÃO DE H&E EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO

A técnica de Hibridização *In Situ* para a detecção do microRNA-122 também foi aplicada a cortes histológicos de camundongo obtidos de blocos parafinados. Estes

blocos fazem parte de uma série de experimentos onde a lesão hepática foi induzida por droga: fenobarbital associado a paracetamol.

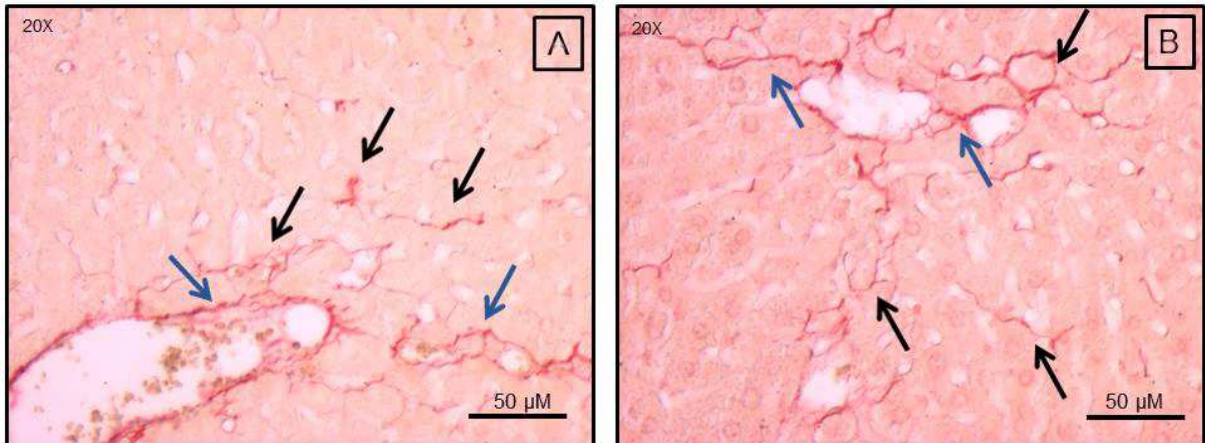
A partir dos cortes histológicos foi realizada a coloração de H&E (Figuras 8A e B) e verificou-se que o tecido de camundongo exibia hepatócitos com discreta vacuolização e hipertrofia, indicando uma possível lesão no fígado.



**Figura 8: Microscopia óptica representando tecidos hepáticos de camundongos tratado com fenobarbital e paracetamol corados com H&E. Observamos nas figuras A e B uma vacuolização dos hepatócitos (setas pretas) e discreta hipertrofia hepatocelular.**

## 5.6 COLORAÇÃO DE PICO SÍRIUS RED EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO

A coloração pelo Picro Sírius Red dos cortes histológicos do fígado de camundongos tratados pelo fenobarbital e paracetamol revelou um aumento focal de fibras colágenas no parênquima hepático. Além disso a acentuação da trama de colágeno é mais acentuada em torno do espaço Porta (Figura 9A) e da veia centrolobular (Figura 9B).



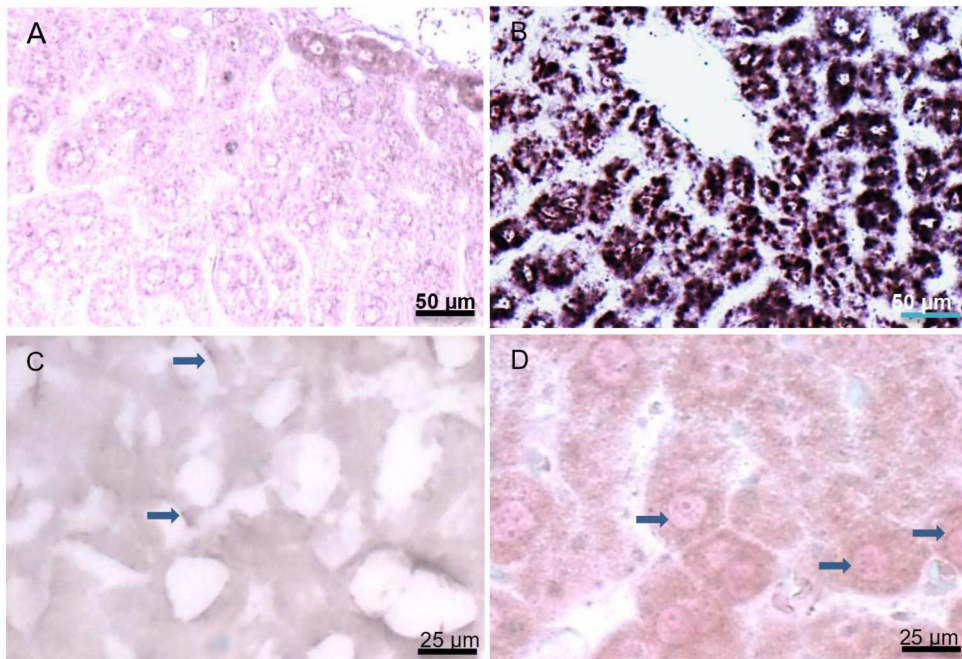
**Figura 9. Microscopia óptica representando tecidos hepáticos de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol corados com picro sirius red. Nas figuras A e B, temos um aumento de colágeno no parênquima do tecido (setas pretas) e uma irradiação do colágeno partindo dos vasos (setas azuis).**

### 5.7 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA O MIRNA 122 EM TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGO COM LESÃO

A hibridização para o microRNA-122 no fígado lesado de camundongos revelou uma redução da reatividade deste microRNA no parênquima hepático (Figuras 10C e D), em comparação ao fígado normal (FIGURA10B). Controle negativo (*scrambled*) não exibiu reatividade (Figura 10A).

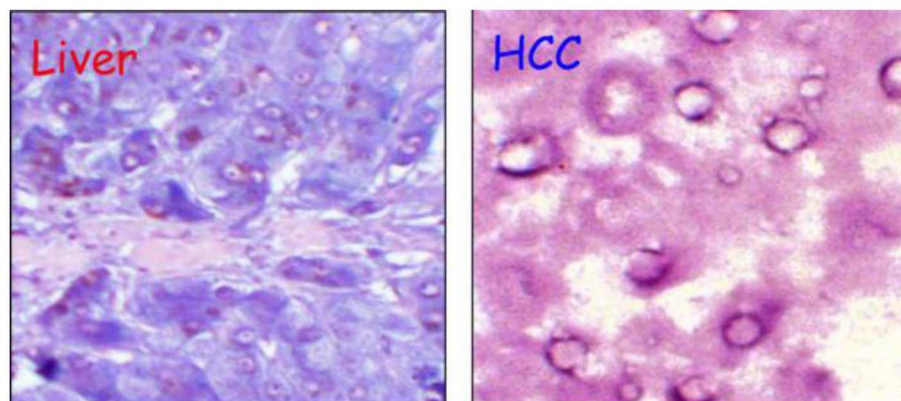
Os resultados estão de acordo com a literatura, na qual estudos mostram que os níveis de microRNAs em tecido hepático com lesão são bem reduzidos (Figura 11). Na figura 11 estão reproduzidos resultados de Bai e colaboradores para o microRNA-122. Sua expressão está aumentada no fígado humano normal e diminuída no fígado com hepatocarcinoma (Bai et al., 2009). Notar a localização perinuclear semelhante a demonstrada no fígado de camundongo lesado (Figura 10D).

Na padronização dos passos críticos, os resultados foram bem parecidos com os do tecido hepático humano, tendo diferença apenas na concentração da proteinase K, que, para os tecidos de camundongo, tivemos resultados com 2 µg/mL. Na figura 10, podemos observar a marcação para o miRNA em tecido de camundongo com lesão.



**Figura 10: Identificação do MicroRNA-122 em tecido hepático de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol por Hibridização *In Situ*.** (A). Incubação da sonda *scrambled* (Controle negativo) no fígado de camundongo normal. Barra de calibração 50 µm; (B). Fígado normal de camundongo exibindo intensa reatividade para o microRNA-122 nos hepatócitos. Barra de calibração 50 µm; (C). Incubação do microRNA-122 em material congelado do fígado de camundongo tratado com fenobarbital e paracetamol. Pequena reatividade em hepatócitos (seta), Barra de calibração: 25 µm; (D). Corte parafinado de fígado de camundongo lesado e incubado com a sonda para microRNA-122. Leve reatividade em região perinuclear de hepatócitos (seta). Barra de calibração: 25 µm.

A escolha do microRNA 122 para a implementação da técnica foi baseada no fato de ser um microRNA específico e abundante no fígado normal, além de estar bem descrito na literatura (CHANG et al., 2004; BAI et al,2009; WANG et al, 2012). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram demonstrados na publicação de Bai e colaboradores (2017), em fígado humano controle (reatividade intensa) e com hepatocarcinoma (baixa reatividade).



**Figura 11. Localização do microRNA-122 em fígado de camundongo por Hibridização *In Situ*.** Reproduzida de Bai et al., 2009. O microRNA-122 foi detectado pela técnica de hibridização in situ utilizando sonda antisenso para microRNA-122 LNA-modificada. Os cortes histológicos foram

hibridizados com a sonda antisense ou *scrambled* conjugada a biotina, capturada pela estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina e o sinal azul foi desenvolvido pelo uso do substrato nitroblue tetrazolio/5 bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. Os núcleos foram contracolorados com o *Fast Red*.

Com esses dados o trabalho foi otimizado reduzindo a quantidade de experimentos para fazer a análise desses miRNAs, sobrando mais tempo para se dedicar à implementação da técnica de Hibridização *In Situ*. Com isso, se teve uma economia de recursos e insumos que seriam usados em outras técnicas e também a compra de outros reagentes que seriam necessários para analisar a expressão do miRNA, caso sua expressão no tecido hepático fosse desconhecida. Outra vantagem na escolha do miRNA 122 é que, sendo abundante no fígado normal, facilita a ligação da sonda ao seu alvo e conseqüentemente a padronização da técnica. Além disso, depois de padronizada, o mesmo miRNA serve como parâmetro para saber se a técnica realmente funciona, pois ele é significativamente reduzido em fígados com lesão e assim pode ser feita a Hibridização *In Situ* com o miRNA 122 pouco expresso, confirmando a implementação da técnica. O padrão de marcação por ISH do miRNA 122 no fígado normal e com lesão é bem diferente, podendo ser facilmente notado e também comparado com os dados da literatura. No quadro 12 tem um levantamento parcial do que gastamos para implementar a ISH com o miRNA 122 e quanto iria se gastar se fosse feito com um miRNA pouco descrito na literatura.

**Quadro 10: Custos com microRNA-122 x custos com outro microRNA**

Custo com microRNA-122		Custo com outro microRNA	
Kit para detecção	10.510,00	Hibridização	13,340,00
Anti-digoxigenin-AP	1.128,00	Sonda ctrl positivo	1.550,00
NBT/BCIP Stock solution	564,00	Kit extração RNA	1.865,00
DIG Wash and Block Buffer Set	1.138,00	Primer	200,00
<b>Total</b>	<b>13.340,00</b>	<b>Total</b>	<b>16.955,00</b>
		Diferença	<b>3.615,00</b>

## 5.8 PROTOCOLO DA ISH PARA O microRNA-122

**Quadro 11: Padronização da técnica de ISH**

Passo 1: Desparafinização	Xilol 1	1x	5 minutos
	Xilol 2	1x	5 minutos
	Xilol 3	1x	5 minutos
Passo 2: Desidratação	Álcool 100%	1x	5 minutos
	Álcool 96%	1x	5 minutos
	Álcool 70%	1x	5 minutos
Passo 3: Lavagem	PBS	2x	5 minutos
Passo 4: Digestão	Proteinase K	37°C	10 minutos
	Obs: Deve ser preparado na hora que for usar. Adicionar 7,5µl de proteinase K a 10 mL de tampão de proteinase K. Concentração final: 15 µg/mL		



Passo 5: Lavar	PBS	2x	3 minutos
Passo 6: Desidratar	Álcool 70%	1x	1 minuto
	Álcool 96%	1x	1 minuto
	Álcool 100%	1x	1 minuto
	Obs: Deixar secar por 15 minutos em um papel toalha limpo		
Passo 7: Hibridização	Sonda	40 nM	miRNA 122
	Hibridizar	52°C	Overnight
	Colocar uma lamínula de vidro estéril em cima do corte e vedar com fixogum.		
	Obs: A concentração da sonda e a temperatura de hibridização precisa ser padronizada para cada miRNA.		
Passo 8: retirada das lamínulas	Retirar o fixogum com uma pinça com cuidado e levar as lâminas a uma cuba com SSC 5x para ajudar a soltar as lamínulas sem danificar o corte.		
Passo 9: Lavagem SSC	SSC 5x	RT	1x 5 minutos
	SSC 1x	52°C	2x 5 minutos
	SSC 0,2x	52°C	2x 5 minutos
	SSC 0,2x	52°C	1x 5 minutos
	Obs: As lavagens são feitas em temperatura da hibridização.		
Passo 10: Barreira hidrofóbica	Fazer uma barreira hidrofóbica em volta dos cortes para auxiliar nos próximos passos		
Passo 11: Bloqueio	O bloqueio vai depender do seu material, humano ou animal.		
	Para humano, BSA 2%/ soro de ovelha 2%		

Passo 12: Anti-corpo anti-DIG	Aplicar o anti-DIG 60 minutos RT Diluição 1:800
Passo 13: Lavagem	PBS-T 3x 3 minutos
Passo 14: Incubação	NBT-BCIP Substrato da fosfatase alcalina 30°C 120 minutos
Passo 15: Lavagem para parar a reação	KTBT 2x 5 minutos
Passo 16: Lavar	Água MilliQ 2x 1 minutos
Passo 17: Contra corar	Nuclear Fast Red 1 minuto
Passo 18: Lavar	Água corrente 10 minutos
Passo 19: Montar	Colocar em água Milli Q e montar com ProLong.

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a detecção do microRNA 122 pelo método de ISH em tecido hepático humano saudáveis e não saudáveis e em fígado de camundongos submetidos a lesão tóxica.

A detecção dos microRNAs pela hibridização *in situ* (ISH) nos tecidos permite o aprofundamento da compreensão das funções individuais dos microRNAs na homeostasia tecidual, desenvolvimento e doença. O método da ISH permite a detecção quantitativa da expressão do miRNA a nível celular, porém ela envolve muitas etapas e com duração longa. Além disso, a natureza frágil do RNA e o pequeno tamanho do microRNA fazem com que este método se torne um desafio. Enquanto a análise do mRNA pela ISH deve ser realizada utilizando sondas longas senso e antisense obtidas pela transcrição *in vitro*, a detecção dos microRNAs *in situ* requer métodos alternativos para a detecção e análise de especificidade. Para tal foram criadas as sondas LNA.

O cuidado para não contaminar as amostras, com a utilização de RNase, tem que ser tomado desde os primeiros passos da Hibridização *In Situ*. É necessário a limpeza dos equipamentos e materiais utilizando RNase Zap, autoclavação ou esterilização, pois a contaminação dessas amostras leva a degradação dos miRNAs e consequente ausência de marcação, o que pode nos levar a uma falsa interpretação dos resultados.

Nas primeiras ISH realizadas neste trabalho, as cubas utilizadas nas etapas da ISH foram limpas com RNase Zap, porém não foram esterilizadas, e não foi encontrada nenhuma marcação para o miRNA 122. Após a esterilização das cubas, houve marcação para o miRNA 122, porém não podemos afirmar que a falta da esterilização foi o motivo da falta de marcação, pois há vários passos críticos na ISH. Entretanto, segundo o manual de instrução do fabricante da sonda, a contaminação das amostras com RNase pode levar à degradação dos miRNAs e, consequentemente, à falta de marcação.

Segundo BANDIERA et al., 2015, o miRNA 122 é o miRNA mais abundante no fígado e é altamente expresso em fígados humanos e de

camundongos normais, e tem sua expressão significativamente reduzida em fígados que apresentam lesão.

Neste trabalho, foi mostrado que nos tecidos obtidos de necropsia, a coloração de H&E não apresentou nenhuma alteração morfológica significativa e a coloração de picrossírius red não apresentou aumento de colágeno no parênquima do tecido, indicando que não há indícios de lesão hepática. Nestes tecidos, o padrão da marcação obtida para o miRNA 122, através de sonda LNA conjugada à digoxigenina e revelada através de anticorpo anti-digoxigenina ligada à enzima fosfatase alcalina, foi semelhante ao padrão demonstrado por Wang et al. (2012) em fígados normais, sendo os hepatócitos fortemente marcados por todo o tecido.

Já nos tecidos humanos obtidos de biópsia, foi observado com a coloração de H&E a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, vacúolos lipídicos e inclusões nos núcleos dos hepatócitos, e, na coloração de picrossírius red, observou-se um aumento de colágeno no parênquima do tecido, indicando lesão hepática.

Segundo BANDIERA et al. (2015) a expressão do miRNA 122 nestes tecidos é reduzida em comparação aos fígados normais e, por isso, era esperado uma marcação com menor intensidade nos hepatócitos, porém, não foi observada nenhuma marcação para o microRNA 122 nestes tecidos. Provavelmente a ausência de reatividade se deve as condições de fixação do material, pois estes foram processados para rotina diagnóstica, na qual a fixação foi realizada com o fixador de Bouin, mistura fixadora contendo, além do formaldeído, ácido pícrico, ácido acético e álcool. É conhecido o fato de que este tipo de fixação não é adequado para a preservação do DNA/RNA, de forma que, a falta de reatividade obtida em nosso trabalho provavelmente se deve também a este fato. Além disso, a presença de RNase durante a fixação, processamento, corte, também podem afetar a reatividade do material (SILVA et al., 2006).

No tecido hepático de camundongos tratados com fenobarbital e paracetamol, verificou-se uma discreta vacuolização e hipertrofia dos hepatócitos e alteração leve da rede colágena no parênquima hepático, mostrando haver uma lesão de leve intensidade no fígado. A reatividade leve, perinuclear, para o microRNA-122 corrobora a presença de agressão no fígado. Este achado está em

consonância com os dados descritos anteriormente na lesão hepática induzida pelo fenobarbital. Tem sido demonstrado que o tratamento de camundongos com fenobarbital leva a diminuição dos níveis de miR-122 no fígado, que chega a 70% do nível basal após 4 horas da introdução do fenobarbital (PARK ET AL., 2015). Além disso, a diminuição dos níveis de miR-122 é temporal e está inversamente correlacionada com a ativação de AMPK (SHIZU et al., 2012).

Mesmo não encontrando indícios de lesão hepática, Marrone et al, 2015 relatam que a expressão do miRNA 122 é reduzida em camundongos tratados com fenobarbital.

A eficiência da ISH depende do número de cópias do microRNA, do tamanho da sonda e concentração assim como das condições de hibridização, como a estringência dos banhos (Kloosterman et al., 2008; Nuovo et al., 2009). Em relação ao sinal para a detecção, sabe-se que a sonda LNA utilizada apresenta dupla ligação para a digoxigenina o que amplifica o sinal para a detecção.

Apesar das muitas etapas e do tempo gasto para a preparação adequada do material, preparação dos reagentes, padronização das etapas, podemos afirmar que o objetivo desta dissertação foi alcançado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bai, S. et al. MicroRNA-122 Inhibits Tumorigenic Properties of Hepatocellular Carcinoma Cells and Sensitizes These Cells to Sorafenib. **Journal of Biological Chemistry**, Columbus, setembro de 2009. Disponível em: < doi: 10.1074/jbc.M109.016774>, acesso em: 12 abril 2017.

BANDIERA, S. et al. miR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. **Journal of hepatology**, Strasbourg, vol. 62, p. 448 - 457, fevereiro\2015.

BECDACHE, O. et al. The “Triple-Q Algorithm:” A practical approach to the identification of liver topography. **International journal of Applied Basic Medical Research**, Qatar, vol. 6, p. 237 - 240, Dez.\2016.

BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. **Veterinary pathology**, Athens, vol. 35, p. 159 - 167, maio\1998.

CHANG, J. et al. miR-122, a Mammalian Liver-Specific microRNA, is Processed from hcr mRNA and May Downregulate the High Affinity Cationic Amino Acid Transporter CAT-1. **Journal RNA Biology**, Philadelphia, vol. 1, p. 106 - 113, junho de 2004.

CHAPPLE, R. H. et al. Characterization of the rat developmental liver transcriptome. **Physiological Genomics**, Missouri, vol. 45, p. 305 - 311, Abril\2014.,

CHEN, X.; YAN, G. Y. Semi-supervised learning for potential human microRNA-disease associations inference. **Scientific Report**, Beijing, vol. 4, junho de 2014.

CHRISTOPHER, A. F. et al MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. **Perspectives in Clinical Research**, Punjab, vol. 7, p. 68 - 74, junho\2016.

CONDORELLI, G.; LATRONICO, M. V. G.; CAVARRETA, E. microRNAs in Cardiovascular Diseases: Current Knowledge and the Road Ahead. **Journal of the American College of Cardiology**, Rozzano, vol. 63, p. 2177 - 2187, junho de 2014.

DAS, D.; BARNES; M. A., NAGY, L. E. Anaphylatoxin C5a modulates hepatic stellate cell migration. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, Cleveland, 30 maio 2014. Disponível em : < <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-9>> Acesso em: 30 outubro 2016.

FEMMINELLA, G. D.; FERRARA, N.; RENGO, G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. **Frontiers in physiology**, Naples, vol.6, janeiro de 2015.

GALL, J. G. The origin of in situ hybridization—a personal history. **Methods**, Baltimore, vol. 98, p. 4 – 9, abril\2016.

- HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Chapel Hill, vol. 87, p. 3 - 14, junho de 2015.
- HE, Y *et al.* MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4. **Cell Signal**, vol. 24, p. 1923 - 1930, outubro\2012.
- HE, Y *et al.* The potential of microRNAs in liver fibrosis. **Cell Signal**, Hefei, vol. 24, p. 2268 - 2272, agosto\2012.
- HA, M.; Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Seoul, vol. 15, p. 509 - 524, agosto\2014.
- HORNBY, R. J. *et al.* microRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury: key current and future issues for translation to humans. **Journal Expert Review of Clinical Pharmacology**, Liverpool, vol. 7, p. 349 - 362, abril de 2014.
- HU, J. *et al.* miR-122 in hepatic function and liver diseases. **Protein & cell**, Beijing, vol 3, p. 364 - 371, maio de 2012.
- JANSSEN, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. **The New England Journal of Medicine**, Toronto, vol. 368, p. 1685 - 1694, maio de 2013.
- JENSEN, E. Technical review: In situ hybridization. **The Anatomical Record**, Auckland, vol. 297, p. 1349 – 1353, agosto\2014.
- KAPLAN, J. B.; KALRA, A.; BIGGINS, S. W. Liver Anatomy and Function. Radiation Therapy for Liver Tumors. **Springer**, Cham, p. 3 - 11, 4 julho 2017. Disponível em : < [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54531-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54531-8_1)> Acesso em: 19 agosto 2017.
- KIM, H. J. *et al.* Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating the miR-34a/SIRT1 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Ulsan, vol. 1852, p. 1550 - 1559, julho de 2015.
- LEVSKY, J.M.; SINGER, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. **Journal of Cell Science**, New York, vol.116, p. 2833 - 2838, julho\2003.
- LI, J. *et al.* Cell-Specific Detection of miR-375 Downregulation for Predicting the Prognosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by miRNA In Situ Hybridization. **PLOS**, Hong Kong, janeiro de 2013. Disponível em : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053582>>. Acesso em 22 março 2017.
- LUA, I.; ASAHINA, K. The Role of Mesothelial Cells in Liver Development, Injury, and Regeneration. **Gut and Liver**, Califórnia, vol. 10, p. 166–176, março de 2016.
- MAQBOOL, R.; HUSSAIN, M. U. MicroRNAs and human diseases: diagnostic and therapeutic potential. **Cell and tissue research**, vol.. 358, P. 1 - 15, outubro\2014.

- MARRONE, A. K.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. The role for microRNAs in drug toxicity and in safety assessment. **Journal Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Jefferson, vol. 11, p. 601 - 611, março 2015.
- MASAKI, T. et al. miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. **Cell host & Microbe**, vol. 17, p. 207 - 228, fevereiro de 2014.
- MCDANIEL, K. et al. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. **Journal of cellular and molecular medicine**, texas, vol. 18, p. 197 - 207, fevereiro de 2014.
- NAVABI, S. F. et al. Curcumin and Liver Disease: from Chemistry to Medicine. **Comprehensive Reviews**, Tehran. Vol. 13, p. 62 - 67, Jan.\2014.
- NIELSEN, B.S. MicroRNS in situ Hybridization. Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**. Jian-Bing Fan; vol. 822, p. 67-84, 2012.
- PARK, H.K. et al. Time-course changes in the expression levels of miR-122, -155, and -21 as markers of liver cell damage, inflammation, and regeneration in acetaminophen-induced liver injury in rats. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, vol. 17, p. 45 - 51, março de 2015.
- PIROLA, C. J. et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. **Gut**, Buenos Aires, vol. 64, p. 800 - 812, Maio\2015.
- REE, M. H. et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Amsterdam, vol. 43, p. 102 - 113, out.\2016.
- RODERBURG, C.; LUEDDE, T. Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. **Hepatology**, Aachen, vol. 61, P. 1434 - 1437, Dez.\2014.
- SALVOZA, N. C. et al. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **PLOS**, Quezon City, Abril\2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153497> > Acesso em: 23 maio\2017.
- SELTH, L.A.; TILLEY, W.D.; BUTLER, L.M. Circulating microRNAs: macro-utility as markers of prostate cancer? **Endocrine Related Cancer**, Leuven, vol. 19, p. 99 - 113, Agosto\2012.
- SHIZU, R et al. MicroRNA-122 Down-Regulation Is Involved in Phenobarbital-Mediated Activation of the Constitutive Androstane Receptor. **PLOS**, Tokyo, julho 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041291> > , acesso em: 27 março 2017.



SHWARTZ Y., ZELZER E. **Nonradioactive In Situ Hybridization on Skeletal Tissue Sections**. In: Hilton M. (eds) *Skeletal Development and Repair. Methods in Molecular Biology*, Totowa, vol 1130, p. 203 - 215, 2014.

SICA, A.; INVERNIZZI, P.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. **Hepatology**, Milan, vol. 59, p. 2034 - 2042, 2014.

SILVA-VALENZUELA, M. G. et al.; In situ hybridization with non-radioactive riboprobes: principles and applications in pathology. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, vol. 42, p. 207-213, junho de 2006.

SPANIEL, C. et al. microRNA-122 Abundance in Hepatocellular Carcinoma and Non-Tumor Liver Tissue from Japanese Patients with Persistent HCV versus HBV Infection. **PLOS**, North Carolina, outubro de 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076867>>. Acesso em: 22 janeiro 2017.

STARCKX, S.; BATHEJA, A.; VERHEYEN, G. R. Evaluation of miR-122 and Other Biomarkers in Distinct Acute Liver Injury in Rats. **Toxicologic Pathology**, Beerse, vol. 41, p. 795 - 804, novembro de 2012.

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Gastroenterology & Hepatology**, Worcester, vol. 10, p. 542 - 552, maio de 2014.

WANG, S. *et al*/ Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity. **Hepatology**, Beijing, vol. 55, p. 730 – 741, fevereiro\2012.

WANG, X.W.; HEEGAARD, N.H.H.; ORUM, H. MicroRNAs in Liver Disease. **Gastroenterology**, Bethesda, vol. 142, p. 1431 – 1443, junho\2012.

TAKAKI, Y. et al. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. **Cancer Science**, Tokyo, vol. 105. p. 1254 - 1260, Out.\2014.

TÜFEKCI, K.U.; MEUWISSEN, R.L.J.; GENÇ, Ş. **The Role of MicroRNAs in Biological Processes**. In: Yousef M., Allmer J. (eds) *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, vol 1107, p. 15 - 31, 2013.

URBANEK, M. O.; NAWROCKA, A. U.; KRZYZOSIAK, W. J. Small RNA detection by in situ hybridization methods. **Science Molecular**, Poznan, vol. 16, p. 13259 - 13286, junho\2015.

Anexo 1

Lista de soluções preparadas, autoclavadas e estocadas antes do início da ISH

**QUADRO 3: Lista de soluções preparadas, autoclavadas e estocadas antes do início da ISH**

Tampão proteinase K	900 mL de água livre RNase 5 mL de Tris-HCl 1 M, pH 7.4 2 mL de EDTA 0.5 M 0.2 mL de NaCl 5 M Ajustar o volume para 1000 mL e autoclavar
Solução SSC 5x	750 mL de água livre RNase 250 mL de SSC 20x Autoclavar
Solução SSC 1x	950 mL de água livre RNase 50 mL de SSC 20x Autoclavar
Solução SSC 0.2x	990 mL de água livre RNase 10 mL de SSC 20x Autoclavar
PBS-Tween 0.1%, pH 7.4	1 L de PBS 1x 1 mL de Tween-20 Autoclavar
KTBT	900 mL de água livre RNase 7,9 g de Tris-HCl 50 mM 8,7 g de NaCl 150 mM 0,75 g de KCl 10 mM Ajustar o volume para 1 L Autoclavar

## Anexo 2

Reagentes preparados no dia do experimento

Reagente de proteinase K 15µg/mL	7,5 µL proteinase K estoque 10 mL tampão proteinase K (Ver quadro 3)
Diluição da sonda	Diluir o tampão ISH microRNA 2x (KIT) 1 : 1 em água livre RNase Colocar cada sonda a ser utilizada em um eppendorf livre RNase Desnaturar as sondas a 90 °C Adicionar o tampão ISH microRNA de acordo com a concentração desejada.
Bloqueio e solução diluente	Adicionar a 15 mL de PBS-T 0,1% 300 µL de soro de ovelha para asolução bloqueio; Retirar 5 mL do tubo da solução anterior para a solução diluente; No tubo da solução bloqueio adicionar 330 µL de BSA 30%, esta pronta para uso; Na solução diluente adicionar 5mL de PBS e 330 µL de BSA 30%, Esta pronta para uso.
Anti-DIG	Diluir em solução diluente preparado acima.
Substrato AP	Adicionar 200 µL de NBT-BCIP a 10mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 9,5 NaCl 1 M., adicionar 20 µL de levamisole.

Anexo 3

Parecer de Aprovação do Comitê de Ética

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**6 DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Detecção dos miRNAs 200a e 200b em tecidos hepáticos humanos pelo método de Hibridização IN SITU.

**Pesquisador:** Regina Coeli dos Santos Goldenberg

**7 Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 51022615.9.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**8 DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.396.975

**9 Apresentação do Projeto:**

Protocolo 310-15, do grupo III. Respostas recebidas em 17.12.2015

Introdução:

Vários tipos de lesão hepática, causadas por agentes tóxicos, desordens metabólicas, infecção viral, trauma e ressecção, desencadeiam uma série de eventos fisiológicos envolvidos no processo de regeneração hepática. Quando as lesões se tornam crônicas e persistentes, o fígado perde a sua capacidade de regeneração espontânea e inicia-se o processo de fibrose, onde as Células Estreladas Hepáticas (HSCs) são as principais células

envolvidas. A regulação da ativação das HSCs pode ser um alvo interessante, onde uma série de estudos têm demonstrado um importante papel de miRNAs neste contexto. Os miRNAs emergiram recentemente como uma classe de pequenos RNAs que regulam redes inteiras de genes durante diferentes processos biológicos. Sabendo-se da multiplicidade de vias que os miRNAs podem afetar, acredita-se que investigar os papéis deles na fibrose hepática, não só poderia avançar nossa compreensão da patogênese, como também pode fornecer novos alvos para intervenção terapêutica. A hibridização in situ (ISH) é uma tecnologia que permite a detecção de sequências de ácidos nucleicos específicos em tecidos emblocados em parafina, congelados e nas células em cultura. Com esta técnica detectamos os miRNAs no local individualmente, que nos trás

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Continuação do Parecer: 1.396.975

informações importantes como os tipos celulares que expressam miRNA específico, sua origem e os níveis de expressão em diferentes

compartimentos do tecido. Esta análise histológica é de crucial importância para a elucidação dos miRNAs nos processos celulares, uma vez que, identificando as células que expressam um miRNA específico, podemos direcionar a interpretação biológica em estudos funcionais, em modelos de doenças e em ensaios celulares e moleculares. Apesar da técnica ISH para miRNA estar bem estabelecida, a sua implementação em um laboratório

molecular ou histológico ainda é um grande desafio.

Hipótese:

Estabelecer um protocolo de detecção dos miRNAs em tecidos hepáticos pelo método de Hibridização IN SITU para auxiliar nas pesquisas que trabalham com essas moléculas.

Metodologia Proposta:

Isolação dos RNAs de tecidos hepáticos emblocados em parafina com o Biostic FFPE Tissue RNA Isolation Kit. Técnica de RT-PCR para detecção e quantificação dos miRNAs. Imunoistoquímica para detecção das células Estreladas Hepáticas. Técnica de Hibridização IN SITU para detecção dos miRNAs.

Metodologia de Análise de Dados:

Será analisado a marcação dos miRNAs por Hibridização IN SITU por microscopia óptica, quantificado e comparado com a quantificação pelo método de RT-PCR nos tecidos hepáticos normal e com doenças crônicas.

Desfecho Primário:

A marcação e detecção dos miRNAs 200a e 200b em maior quantidade nos tecidos hepáticos com doenças crônicas em relação aos tecidos hepáticos sem doenças hepáticas, já que está descrito na literatura que a expressão desses miRNAs está Up-regulated nos tecidos com doenças crônicas.

Desfecho Secundário:

Estarem equivalentes as quantificações dos miRNAs nos tecidos hepáticos com doenças crônicas e nos tecidos hepáticos sem doenças pelos métodos de RT-PCR e Hibridização IN SITU.

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br



Continuação do Parecer: 1.396.975

### 10 Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implementar a técnica de hibridização in situ no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, através da detecção de miRNAs em tecido hepático com doença crônica.

Objetivo Secundário:

Realizar a hibridização in situ para os miR200-a e miR200-b em tecidos hepáticos com doenças crônicas e Dominar a técnica para adaptar a outros miRNAs e tecidos.

### 11 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos:

Os riscos são mínimos, pois tratam-se de amostras de tecidos hepáticos com doenças crônicas já ressecados e que estão arquivados no Serviço de Anatomia-patológica do Hospital Clementino Fraga Filho; assim como os blocos em parafina não serão esgotados no estudo, além de serem desenvolvidas ao seu local de origem, ou seja, ao Serviço de Anatomia-patológica do Hospital clementino fraga filho.

Benefícios:

A técnica de Hibridização IN SITU vai auxiliar nas pesquisas com essas moléculas para estudar sua origem, onde atuam e de quais processos biológicos participam, abrindo novos caminhos para a compreensão de patogêneses e criando expectativas para novas terapias.

### 12 Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_593200.pdf postado em 17/12/2015

Os microRNAs estão envolvidos em vários processos celulares e estudos mostram que eles participam do desenvolvimento de várias patologias. Para estudarmos melhor essas moléculas se faz necessário técnicas de detecção cada vez mais específicas e este trabalho propõe a implementação da técnica de Hibridização IN SITU no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. Para isso usaremos tecidos hepáticos com doenças crônicas, onde se desenvolve um processo de fibrose em que as Células Estreladas Hepáticas são ativadas, estando os mirRNAs envolvidos nesta ativação e Up-regulated nesses tecidos.

### 13 Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Listas de Inadequações".

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Continuação do Parecer: 1.396.975

#### 14 Recomendações:

Para leitura em relação a eventuais futuras submissões:

Algumas pesquisas utilizam material biológico oriundo de acervo que não corresponde nem a um biobanco nem a um biorrepositório, tendo sido coletado para fins assistenciais. Este é o caso, por exemplo, das biópsias armazenadas em blocos de parafina de um serviço de Anatomia Patológica. O material biológico obtido com fins assistenciais pode ser utilizado em pesquisa, desde que devidamente autorizado pelo participante, por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico da pesquisa (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê de Ética em Pesquisa). Adicionalmente, tais bancos podem solicitar seu registro, como biobanco na Conep por meio da apresentação de um Protocolo de Desenvolvimento, que será avaliado segundo as normativas vigentes para biobancos.

#### 15 Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1 . Folha de rosto:

a) Deve constar o patrocinador, segundo definição da Res. 466\12.

Resposta: O sistema já imprime a Folha de Rosto com “Não se Aplica” quando a opção é Financiamento Próprio, não sendo possível mudar.

Análise: pendência atendida.

2 . Quanto ao Projeto:

Segundo o pesquisador:

Riscos: Não há riscos

A Res. CNS n. 466 de 2012, item V: Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Os danos, decorrentes da pesquisa, podem ser imediatos, no plano individual ou coletivo e Res CNS n. 466 de 2012, item III.2.r: risco da pesquisa – possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente. Solicita-se adequação.

Resposta: Trata-se de um assunto retrospectivo onde os riscos são mínimos, pois tratam-se de amostras de doenças hepáticas crônicas já ressecadas e que estão arquivados no Serviço de Anatomia-patológica do hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Os blocos em parafina não serão esgotados no estudo, além de serem devolvidos ao seu local de origem, ou seja, ao Serviço de Anatomia-patológica do Universitário Clementino Fraga Filho.

Análise: pendência atendida

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Continuação do Parecer: 1.396.975

### 3 . Orçamento detalhado

Norma Operacional CNS nº 001 de 2013 item 3.3.e:

a) O Orçamento financeiro apresentado não está de acordo com o solicitado pela Norma Operacional CNS nº 001 de 2013 conhecimento do conteúdo do protocolo detém 3.3.e. Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro detalhado, que especifique todos os recursos, fontes, destinações, em especial os custos operacionais bem como qual é fonte financiadora. Solicita-se adequação e esclarecimento quanto aos valores apresentados para investigação de apenas 10 amostras.

Solicita-se justificativa.

Resposta: foi apresentado orçamento detalhado

Análise: pendência atendida

### 4 . Carta de apresentação do Projeto:

A carta deve constar também a finalidade do estudo (p.ex.: elaboração da monografia de conclusão de curso de graduação, especialização, mestrado ou doutorado).

No projeto de pesquisa apresentado consta ser Projeto de Mestrado Profissional para Formação em Pesquisa Biomédica.

Resposta: Segue nova Carta de Apresentação com a devida Informação:

Finalidade do Estudo: Dissertação para Mestrado Profissional.

Análise: pendência atendida

### 5 . Anexar ao cronograma que a pesquisa só será iniciada após aprovação pelo CEP.

Resposta: Segue cronograma com o anexo solicitado.

Análise: pendência atendida

## 16 Considerações Finais a critério do CEP:

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
CLEMENTINO FRAGA FILHO



Continuação do Parecer: 1.396.975

semestrais que permitam ao Cep acompanhar o desenvolvimento dos projetos. Esses relatórios devem conter informações detalhadas nos moldes do relatório final contido no Ofício Circular n. 062/2011:

<[http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/aquivos/conep/relatorio\\_final\\_encerramento.pdf](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/conep/relatorio_final_encerramento.pdf)>

2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

**17 Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_593200.pdf	17/12/2015 15:59:22		Aceito
Outros	Carta_apresentacao_resposta.doc	17/12/2015 15:57:11	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	carta_apresentacao_resposta.pdf	17/12/2015 15:53:16	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Orçamento	Orcamento_financeiro_resposta.docx	17/12/2015 15:44:42	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	carta_resposta.docx	17/12/2015 15:40:17	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	17/12/2015 15:37:54	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Cronograma	cronograma_execucao_resposta.pdf	17/12/2015 15:35:47	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Apendice.docx	16/11/2015 12:01:41	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Carta_apresentacao.doc	16/11/2015 11:41:43	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Apresentacao_do_projeto.doc	12/11/2015 17:15:07	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	28/10/2015 13:19:57	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.doc	28/10/2015 13:18:58	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Orçamento	Orcamento_financeiro.pdf	27/10/2015 15:19:23	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Cronograma	Cronograma_de_execucao.pdf	27/10/2015 15:16:28	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Instituicao_coparticipante.pdf	27/10/2015 11:53:20	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Documento_de_encaminhamento.pdf	27/10/2015 11:47:20	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Apresentacao_do_projeto.pdf	27/10/2015 11:44:22	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Outros	Lista_dos_curriculos.pdf	27/10/2015 11:40:43	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Ausencia_de_TCLE.pdf	27/10/2015 10:54:07	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	27/10/2015 10:50:16	Regina Coeli dos Santos Goldenberg	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**18 Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 01 de Fevereiro de 2016

---

**19 Assinado por:**  
**Carlos Alberto Guimarães**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 21.941-913

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**E-mail:** cep@hucff.ufrj.br