

VI – MATERIAL E MÉTODOS

1. Murganhos

Todos os murganhos utilizados neste trabalho foram mantidos em instalações SPF (“Specific Pathogen Free”), com um ciclo de luz de 12 horas e alimentados com comida e água autoclavadas, segundo a legislação em vigor (Portaria n.º 1005/92).

2. PCR para genotipagem de murganhos da estirpe mycTCR

Um dos objectivos do estágio foi a optimização do PCR para genotipagem de murganhos da linha mycTCR. Os passos da optimização do protocolo encontram-se descritos nos resultados, e o protocolo final encontra-se descrito neste capítulo.

a) Extracção de DNA de cauda de murganho

O DNA para genotipagem dos murganhos foi extraído a partir de 5mm de cauda de cada animal a genotipar. Adicionou-se 300µL de solução de lise e 2µL de Proteinase K (10mg/mL) a cada amostra, e incubou-se a 55°C até se verificar que as caudas estavam completamente digeridas. De seguida, centrifugaram-se as amostras durante 5min a 13000rpm e removeu-se o sobrenadante para novos tubos. Adicionou-se 300µL de isopropanol e homogeneizaram-se as amostras invertendo os tubos algumas vezes; neste passo, o DNA precipitou, formando na maioria das vezes um *pellet* esbranquiçado visível a olho nu. Centrifugaram-se as amostras durante 1min a 13000rpm, rejeitando-se o sobrenadante com o cuidado para não perder o *pellet*. Adicionou-se 500µL de etanol a 70% e inverteram-se os tubos algumas vezes de forma a lavar o DNA. Voltou-se a centrifugar as amostras durante 1min a 13000rpm, rejeitando-se o sobrenadante. Deixou-se evaporar os resíduos do etanol à temperatura ambiente durante 10min, dissolvendo-se depois o DNA em 50µL de TE (Tris-EDTA, agente quelante). Incubou-se o DNA durante 10min a 65°C de forma a inactivar as DNases e guardaram-se as amostras a 4°C até à sua utilização.

b) Quantificação do DNA extraído

Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Este aparelho quantifica o DNA de cadeia dupla (entre outros) de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

onde **C** é a concentração de DNA em ng/μL, **Abs** a absorvância (neste caso a 260nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA), **e** o coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50ng.cm/μL) e **b** a altura da coluna criada no espectrofotómetro (que neste caso corresponde a 1cm). Assim, quando o NanoDrop mede a absorvância a 260nm obtêm-se um valor, que multiplicado por 50 (constante **e**) indica a concentração de DNA na amostra, em ng/μL.

É importante medir também a absorvância a 280nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de proteínas, e a 230nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de contaminantes orgânicos. Assim, fazendo as razões da absorvância 260/280 e 260/230 pode-se verificar a pureza da amostra. Quanto mais pura for a amostra (ou seja, com menos quantidade de proteínas ou solventes orgânicos utilizados aquando a sua extracção), maiores serão estas razões. Geralmente, utiliza-se como valor de referência de pureza do DNA 1,8, ou seja, considera-se que a amostra é pura quando $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ e $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$.

c) Preparação da *MasterMix* para PCR

A preparação da mistura para o PCR foi efectuada segundo o número de amostras a amplificar, e depois dividida pelos microtubos correspondentes, de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 1 – Quantidades iniciais (pré-otimização) dos vários componentes utilizados na preparação da MasterMix para PCR de amplificação da cadeia α e cadeia β do TCR transgénico

Concentração	Reagentes		Volume (uL)		MasterMix (volume x nº amostras)	
			Cadeia α	Cadeia β	Cadeia α	Cadeia β
10x	Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		5	5		
10 mM	dNTPs		1	1		
25 mM	MgCl_2		2,5	1,5		
50 pmol/uL	Primers	Sense	1	1		
50 pmol/uL		Anti-Sense	1	1		
	H_2O (nuclease-free)		35,5	36,5		
Puro	DMSO (5%)		2,5	2,5		
5u/uL	Taq		0,5	0,5		
100ng	DNA		(1)	(1)	Total/49 μL = nº amostras	
			Total: 50 uL			

[Nº de amostras: nº amostras a amplificar + controlo (+) + controlo (-) + (1)]

A Taq Buffer com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, os dNTPs, o MgCl_2 e a *Taq polymerase* utilizadas eram todos da Fermentas. A água nuclease-free era da Ambion.

O conjunto de primers (biomers.net) utilizados está descrito na tabela seguinte:

Tabela 2 - Descrição dos primers utilizados na PCR de genotipagem de murganhos myc TCR (em stock, após ressuspensão)

Nome	[] (pmol/uL)	Sequência	bp	Amplificação
α -TransSense	100	5' - AGA GGA ACC TGG GAG CTG TG - 3'	20	Fragmento com 518 bp
α -Trans AntiSense	100	5' - CGT ATT TGT AGT TTC CTG TAT TCT C - 3'	25	
β -TransSense1	100	5' - TTC ACA GGC CCT TTG GAG ACG - 3'	21	Fragmento com 310 bp
β -Trans AntiSense1	100	5' - CTT GGG GGC CCG GGC TGC TG - 3'	20	

Como a solução de trabalho tem de ter [] = 50 pmol/ μL foi necessário fazer uma diluição 1:2 da solução stock.

No anexo II, encontra-se descrito o cálculo da T_m (*melting temperature*) e da T_a (*annealing temperature*) dos primers.

d) Controlos positivos α e β (DNA plasmídico) e controlo negativo

Como em qualquer procedimento laboratorial, foram utilizados controlos positivos e negativos de forma a verificar a veracidade dos resultados finais. Assim, como controlos positivos, utilizaram-se os *constructs* da cadeia α e da cadeia β de acordo com as seguintes diluições:

Tabela 3 - Diluições utilizadas dos constructs de controlo positivo para a cadeia a e b

Controlo	Diluição
Controlo $\alpha \oplus$ (stock)	1:100 ¹
Controlo $\beta \oplus$ (stock)	1:20

Como controlo negativo, utilizou-se água em vez de DNA, de forma a verificar se havia alguma contaminação no produto final do PCR, já que não seria de esperar qualquer amplificação nestas amostras.

e) Programa de PCR

Como ponto de partida para a amplificação, antes da optimização, utilizou-se o MyCycler (BioRad), programado da seguinte forma:

Tabela 4 - Tempos, temperaturas e ciclos do PCR, antes da optimização

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Nº Ciclos
4	95	1x
1	95	40x
1	58	
1	72	
10	72	1x
∞	4	∞

f) Electroforese

Os resultados de cada PCR foram analisados em gel de 1% de agarose em TAE1x, sendo usado 100 μ L de Brometo de Etídio (0,5mg/mL) por cada 100mL de gel. Foi usado 5 μ L de Loading Buffer por cada 20 μ L de amostra. Para saber os pesos moleculares dos produtos de PCR utilizaram-se 2 μ L de *GeneRulers DNA Ladders* (Fermentas). Os marcadores moleculares utilizados estão descritos figura 7:

¹ Como com esta diluição as bandas aparecem ainda muito concentradas, pode-se fazer diluição do controlo $\alpha \oplus$ de 1:1000.

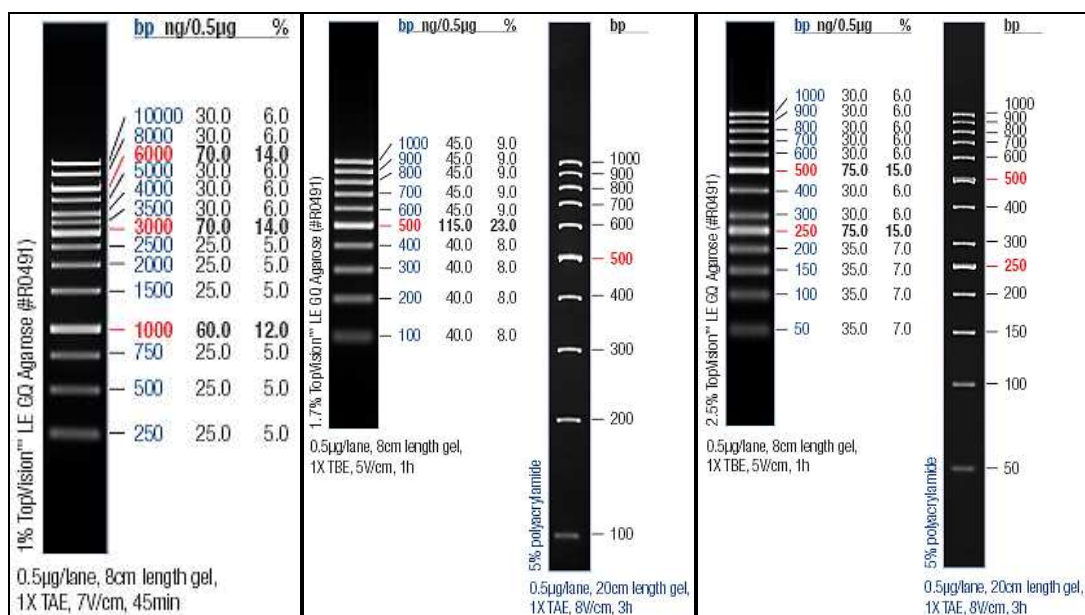


Figura 7 - Marcadores moleculares utilizados na corrida dos produtos do PCR em géis de electroforese, , 50bp, 100bp e 1kbp, respectivamente

Todos os géis foram fotografados numa câmara de fotodocumentação da Alpha innoTec e analisados, de forma a saber que ratinhos continham no seu genoma o *construct* que expressa a cadeia α e o que expressa a cadeia β transgénicas.

3. Citometria de Fluxo

Recolheu-se o sangue dos murganhos para tubos de 1,5mL com 200µL de solução anticoagulante (ver anexo IV) após um pequeno corte na cauda dos animais em estudo; após esta operação, centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos a 1200rpm, à temperatura ambiente, para retirar a solução anticoagulante.

Para promover a lise dos eritrócitos utilizou-se ACK (ver Anexo IV). Após a lavagem das células, utilizaram-se os anticorpos anti-V α 2 (B20.1), anti-V α 11 (RR8.1) e anti-V β 10 (B21.5), todos eles provenientes de sobrenadantes de hibridomas. Como esta era uma marcação indirecta, utilizou-se o anticorpo secundário Goat anti-Rat FITC (isotiocianato de fluoresceína, Southern Biotechnology Associates, Inc).

Para marcação directa da população de CD4 e CD8, as células foram incubadas inicialmente com 10% de soro de rato (para bloquear qualquer ligação inespecífica dos anticorpos CD4 e CD8 aos anticorpos já ligados), e de seguida com os seguintes anticorpos: anti-CD4 PeCy5 (ficoeritrina isocianina5, Biolegend) e anti-CD8 Pe (ficoeritrina, BD Pharmingen).

Para a pesquisa de marcadores de activação para o estudo da resposta dos murganhos transgénicos após a infecção com *M. avium*, usaram-se os seguintes anticorpos: anti-V β 10 (com anticorpo secundário conjugado com FITC), anti-CD4 PeCy5, anti-CD62L PE (Me14), anti-CD44 PE (IM7) e anti-CD19 APC (1D3), todos da BD Pharmingen.

No Anexo I encontra-se o protocolo geral, mais detalhado, utilizado nos estudos realizados por citometria de fluxo.

Todas as análises foram realizadas num FACScalibur equipado com o software CellQuest (Becton Dickinson) e baseadas na aquisição de 30000 eventos.

4. Infecção de murganhos com *M. avium* 2447

Descongelou-se uma alíquota, e prepararam-se várias diluições do inóculo (até à diluição 5 – ver Anexo I). Preparou-se o inóculo de forma a infectar-se cada animal com 1×10^6 CFUs; no entanto, na realidade, os animais foram infectados com 5×10^5 CFUs/mL.

5. Marcação de células infectadas com *M. avium* por imunohistoquímica e imunofluorescência

5.1. Técnicas de imunohistologia

a) Preparação dos tecidos antes da marcação

Antes de se aplicar qualquer técnica de imunohistologia é necessário preparar os tecidos para assegurar a marcação² correcta das moléculas pretendidas.

A fixação dos tecidos é feita para modificar a estrutura das proteínas intencionalmente, para evitar que estas sejam eluídas ou degradadas. A fixação pode alterar os epítopes reconhecidos pelo anticorpo, aumentando ou diminuindo a capacidade do anticorpo de os reconhecer.

² Em todo o documento escrito utilizou-se o termo “marcação” como sinónimo de imunoreacção

Quando a fixação é inadequada, os resultados finais das marcações podem ser interpretados incorrectamente. Por isso, devem-se respeitar os tempos e condições de fixação descritas nos protocolos. Geralmente, cortes de tecido congelado são fixados com acetona à temperatura ambiente durante 5s. Devem ser ainda reprocessados em acetona a 4°C durante 10 min e depois rehidratados no tampão de lavagem durante 5 min antes de se começar o processo de marcação.

De forma a garantir que a marcação observada no final da técnica de imunohistologia escolhida corresponde à marcação específica dos anticorpos escolhidos, são usados reagentes para reduzir a probabilidade de ocorrência de ligações inespecíficas entre os anticorpos e outros componentes dos tecidos independentes do antígeno alvo. Em qualquer tecido existem moléculas altamente carregadas que fazem parte dos

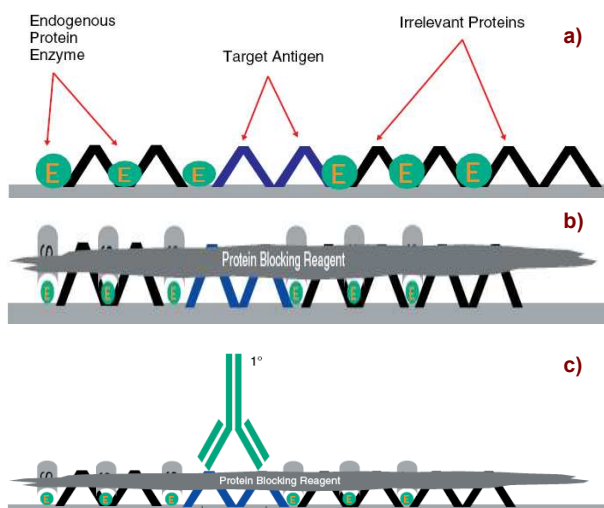


Figura 8 - a) Tecido antes do bloqueamento, onde se podem observar enzimas endógenas, proteínas irrelevantes e o antígeno alvo; b) Bloqueamento das enzimas endógenas e das proteínas irrelevantes; c) Adição do anticorpo primário que, devido à sua grande afinidade, se liga ao antígeno de interesse (adaptado de Key, 2006).

componentes normais do tecido. Quando se aplica o anticorpo primário e o antígeno específico está presente, estes ligam-se, formando uma reacção específica. No entanto, quando o tecido não foi bloqueado adequadamente, o anticorpo primário combina-se também com locais não específicos, resultando numa reacção inespecífica. As ligações inespecíficas devem-se a ligações a receptores Fc das imunoglobulinas ou a outras interacções entre proteínas. Se isto acontecer, o anticorpo secundário irá ligar-se também aos anticorpos primários ligados inespecificamente, levando à presença de *background* nos resultados finais da marcação (Key, 2006).

b) Imunohistoquímica

O método de imunohistoquímica usado neste trabalho baseia-se na detecção indirecta de moléculas de

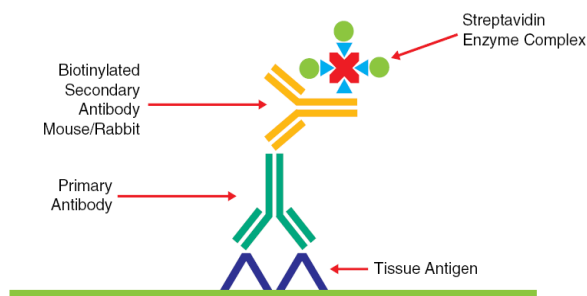


Figura 9 - Imunohistoquímica indirecta com anticorpo secundário biotinizado, conjugado com o complexo streptavidina (Adaptado de Key, 2006)

interesse através do uso de anticorpos específicos para as mesmas, utilizando-se um anticorpo primário, específico para a molécula de interesse, e um anticorpo secundário biotilado. A *streptavidina* (de *Streptomyces avidinii*) tem grande afinidade para a biotina e possui 4 locais de ligação para a mesma. Assim, a peroxidase (substrato da enzima – peroxidase - ligada à streptavidina) irá ligar-se não à biotina presente no anticorpo secundário, mas aos complexos Streptavidina-Peroxidase que se encontram ligados às três biotinas disponíveis, aumentando assim o sinal obtido após o uso do agente cromogénico. Podem ser usados vários agentes cromogénicos, consoante o resultado pretendido. A Diaminobenzidina (DAB) é geralmente o cromogénio mais usado. Este cromogénio confere uma cor castanha ao produto da reacção, produto este altamente insolúvel em álcoois e outros solventes orgânicos.

Através da técnica de imunohistoquímica, podem-se fazer marcações simples e duplas, ou seja, marcar uma ou duas moléculas diferentes, usando dois agentes cromogénicos diferentes de forma a obter duas cores nas marcações.

c) Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência usada neste trabalho é também indirecta sendo o anticorpo secundário conjugado com um fluorocromo. Os fluorocromos absorvem energia a um comprimento de onda específico e emitem fluorescência num outro comprimento de onda, e assim, as moléculas marcadas com determinado fluorocromo são visíveis utilizando um microscópio de fluorescência.

A técnica de imunofluorescência apresenta vantagens sob a imunohistoquímica já que utilizando anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos é possível marcar mais de uma molécula de interesse em simultâneo. No entanto, através de imunofluorescência não se consegue ter a percepção da morfologia do tecido, observável na imunohistoquímica.

5.2) Escolha dos anticorpos para marcação de macrófagos e micobactérias

Os anticorpos primários utilizados foram escolhidos consoante a molécula a marcar. Assim, para marcar macrófagos, escolheu-se o anticorpo “Rat Anti-Mouse F4/80 Antigen Purified” (Serotec). Este anticorpo reconhece a molécula F4/80 e é vastamente usado na identificação e estudo de macrófagos de ratinho em condições normais e patológicas. A molécula F4/80 é um membro da família EGF-TM7, uma glicoproteína com cerca de 160kDa, e é expressa em vários tipos de macrófagos, tais

como células de Kupffer do fígado, macrófagos residentes na medula óssea, macrófagos da zona cortical do timo, macrófagos da polpa vermelha do baço, macrófagos medulares dos nódulos linfáticos e células microgлияis do cérebro. São também encontrados níveis baixos de F4/80 em monócitos e em certos subgrupos de macrófagos maduros. Por outro lado, as células Langerhans (células dendríticas imaturas presentes na epiderme) e algumas células dendríticas mielóides CD8⁻ são também F4/80⁺, apesar da sua expressão aparentemente diminuir aquando a integração do antigénio por parte destas células e migração das mesmas para o tecido linfóide já que as células dendríticas maduras em zonas de células T não expressam níveis detectáveis de F4/80. Existem ainda evidências dos eosinófilos serem F4/80 positivos (van den Berg e Kraal., 2005).

Para marcar micobactérias utilizou-se o anticorpo “Rabbit anti-*mycobacterium spp*”. Este anticorpo reage especificamente com o lipoarabinomanano, um componente característico da membrana celular das micobactérias.

Os anticorpos secundários foram escolhidos consoante o animal onde o anticorpo primário foi produzido e a cor fluorescente emitida pretendida

5.3) Controlos positivos e negativos

Como em qualquer experiência/técnica, foi necessário realizar correctamente controlos negativos e positivos para assegurar que a marcação observada era específica. Neste caso, foram usadas lâminas com tecido infectado e tecido não infectado (para controlo negativo da presença de micobactérias), onde só se usou o anticorpo secundário (para ver as ligações inespecíficas do anticorpo secundário) ou não se usou qualquer anticorpo (para verificar a autofluorescência). É também importante o uso de um controlo isotópico. Como controlo isotópico é geralmente usado um anticorpo do mesmo tipo do anticorpo primário, neste caso um IgG, que permite estimar as ligações não específicas do anticorpo primário a antigénios do tecido. O controlo isotópico mostra quais são as ligações sem significado de reacção cruzada com antigénios de superfície das células nas secções dos tecidos. Este anticorpo deve ser usado em concentrações e condições de coloração idênticas às do anticorpo primário.

Assim, as marcações realizadas foram: lâminas com o tecido de interesse marcado com anticorpo primário e secundário (marcação desejada), com anticorpo

anti-IgG e anticorpo secundário (controlo isotópico), apenas com anticorpo secundário (para verificar as ligações inespecíficas por parte deste anticorpo) e sem qualquer anticorpo (para verificar a autofluorescência).

5.4) Protocolos

Os protocolos de **imunofluorescência** e **imunohistoquímica** utilizados inicialmente foram gentilmente cedidos por uma estudante do laboratório, tal como a diluição dos anticorpos.

Após a optimização, criou-se um novo protocolo para cada uma das técnicas, mais adequado às marcações pretendidas, de acordo com os resultados observados nos ensaios.

No Anexo I, encontram-se os protocolos finais de imunofluorescência e imunohistoquímica. Os protocolos iniciais não são aqui referidos já que, ao longo dos resultados, são explicadas as alterações efectuadas e o porquê das mesmas.