

VII – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação de um potencial novo modelo animal para o estudo da resposta T em infecções por micobactérias

1.1) Murganhos transgênicos mycTCR

O reportório das células T é determinado pelo conjunto de receptores das células T (TCRs) expressos na superfície dos linfócitos T periféricos. A composição desta população de TCRs periféricos é moldada por dois processos sequenciais: o rearranjo e expressão dos genes dos TCRs nos timócitos em desenvolvimento e a subsequente selecção tímica (Burns, 1998).

A diversidade do reportório de TCRs de um indivíduo é gerada pelo rearranjo dos segmentos dos genes V, D e J, e pela combinação de diferentes cadeias α e β (Jameson, 1991).

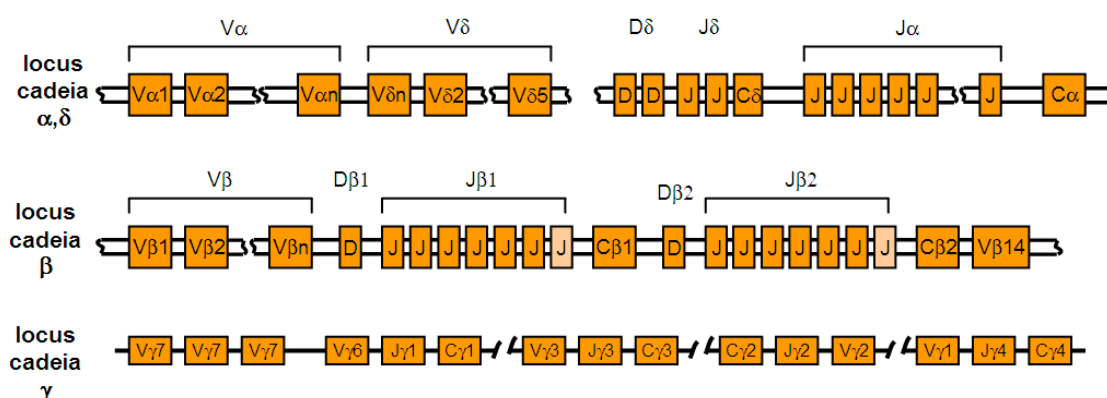


Figura 10 - Genes dos polipeptídeos TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ de murganho; o loci da cadeia δ está embutido entre o locus da cadeia α , e ocorreu duplicação em série no locus da cadeia β . O último gene de cada grupo de genes $J\beta$ e o gene $V\gamma 3$ são pseudogenes (adaptado de Roitt, 1998)

Os murganhos da linha mycTCR são animais transgênicos que reconhecem potencialmente células infectadas por *M. avium*. Estes animais são transgênicos para o TCR ("T cell receptor") $V\alpha 11J\alpha 33-V\beta 10J\beta 2.5$, tendo sido criados no fundo genético FBV através da inserção de cassetes recombinantes TCR $\alpha\beta$ com o DNA transgênico e posteriormente cruzados com fêmeas C57BL/6 de forma a ficarem no fundo genético correcto. Estes cruzamentos ainda estão a decorrer já que somente após 10 gerações nascidas em fundo C57BL/6 é que se pode considerar os animais em fundo correcto.

1.2) Otimização do PCR para genotipagem de murganhos mycTCR

Uma das técnicas mais poderosas usadas correntemente em biologia molecular é a amplificação de DNA através da reacção de polimerização em cadeia (PCR). Esta reacção, quando encontradas as condições ideais, mostra uma eficiência exemplar, já que se conseguem sintetizar quantidades na ordem dos microgramas a partir de uma única molécula de DNA (Rychlik *et al.*, 1990).

Para se conseguir encontrar as condições óptimas para um determinado PCR é necessário efectuar vários ensaios, tendo em conta todas as variáveis que podem influenciar esta reacção: *primers*, dNTPs, iões necessários para a amplificação (por exemplo, Mg^{2+}), tampão, número de ciclos de amplificação, temperatura de *annealing* (T_a – temperatura de ligação dos primers ao DNA alvo), aditivos e adjuvantes à reacção.

Os parâmetros cíclicos afectam em muito o PCR. Por exemplo, o tempo de desnaturação tem de ter duração suficiente para que se consiga a total desnaturação da amostra de DNA, a temperatura de *annealing* óptima depende da Temperatura de fusão dos primers (T_m – temperatura à qual 50% dos primers estão ligados ao DNA alvo formando uma cadeia dupla e 50% estão desnaturados – cadeia simples), o tempo de alongamento óptimo depende do comprimento do DNA alvo a ser amplificado e o número óptimo de ciclos depende da abundância do DNA alvo na amostra inicial (Roche, PCR Applications Manual).

A escolha da temperatura de *annealing* (T_a) dos *primers* é provavelmente o factor mais crítico na optimização de um PCR. Se a temperatura for demasiado alta, não ocorre a ligação dos primers com o DNA alvo, enquanto que, se a temperatura for demasiado baixa, a formação de ligações inespecíficas aumenta drasticamente. Por estas razões, a T_a tem de ser determinada e optimizada empiricamente (Sambrook *et al.*, 2001). No entanto, na maioria das vezes, a T_a é cerca de 5°C inferior à T_m mais baixa do par de primers (o cálculo das T_m e T_a dos *primers* encontra-se em anexo – Anexo II) (Coyne, 2001).

A concentração dos *primers* depende inteiramente da amostra a amplificar. Quando são usadas concentrações superiores às ideais, pode haver formação de produtos não específicos e dímeros de *primers*, enquanto que, utilizando concentrações inferiores às ideais, o rendimento de amplificação do produto desejado é reduzido devido ao esgotamento dos *primers* antes do fim da amplificação (Roche, PCR Applications Manual).

No início das genotipagens, as condições do PCR utilizadas foram as testadas anteriormente noutro laboratório [0,75mM MgCl₂, Taq Buffer 1x (75mM Tris-HCl pH 8.8, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 0,01% Tween20), 1μM de cada primer, 0,2mM de dNTPs, 0,05u/μL de Taq polimerase e 1μL de DNA, em 50μL de mistura de reacção (MasterMix); cada passo de amplificação do PCR tinha a duração de 1min, sendo a temperatura de desnaturação 95°C, a temperatura de annealing 60°C e a temperatura de polimerização de 72°C, repetido durante 30 ciclos]. No entanto, como o termociclador, os reagentes da MasterMix e a enzima usados eram diferentes, o PCR não estava a funcionar correctamente (já que repetindo o mesmo PCR nas mesmas condições, obtinham-se resultados diferentes) e por isso, as condições tiveram de ser optimizadas.

O dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido usado como um adjuvante para o PCR, já que aumenta a eficácia e a especificidade da amplificação, obtendo-se maior quantidade de produto desejado e menor quantidade de produtos inespecíficos. Este adjuvante tem sido também usado quando o DNA alvo é muito rico em nucleótidos G e C, já que esta quantidade dificulta a amplificação por PCR (Kitade *et al.*, 2003).

Assim, testaram-se três concentrações de DMSO: 0, 5 e 10%. Aumentou-se também o número de ciclos de amplificação de 30 para 35. Para este ensaio utilizaram-se apenas os controlos positivos (e negativos, para fiabilizar os resultados), ou seja, o construct de DNAp da cadeia α e β.

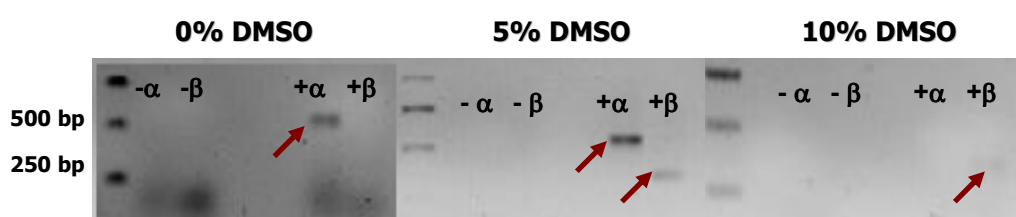


Figura 11 - Ensaio de três concentrações de DMSO (0, 5 e 10%) na amplificação dos fragmentos da cadeia α e β: as amostras utilizadas foram de DNAp (controlos positivos do PCR)

Verificou-se então que, quando se introduzia 5% de DMSO ambos os controlos, α e β, eram amplificados. Verificou-se ainda que, quando não se usava DMSO apenas o controlo α era amplificado, e quando se usava 10% de DMSO, a cadeia β era amplificada, mas a banda que aparecia era muito ténue.

Um PCR para amplificação de apenas DNA genómico (DNA_g) é mais inespecífico do que um PCR onde se amplifica DNA_g juntamente com DNA plasmídico (DNA_p) ou só DNA_p (controlos positivos). Para confirmar estes resultados, testaram-se então estas condições para amostras de DNA genómico (DNA_g), com e sem o construct (DNA_p). Aumentou-se ainda o número de ciclos de PCR para 40, já que outros PCR's feitos anteriormente não demonstraram amplificação alguma.

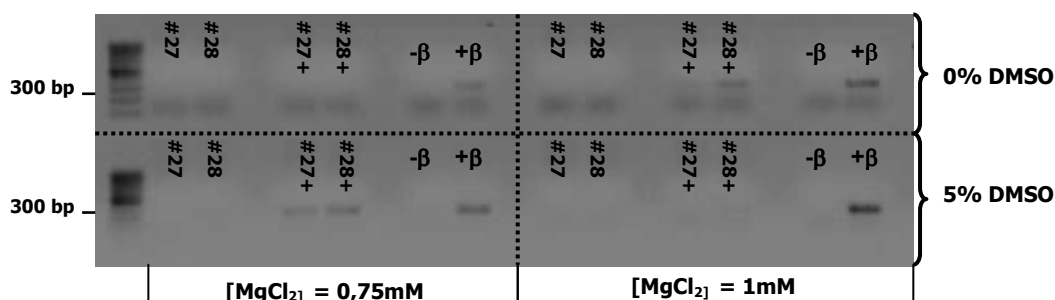


Figura 13 - Ensaio representativo da escolha das concentrações óptimas de DMSO (0 e 5%) e MgCl₂ (0,75 e 1mM) a utilizar para a amplificação da cadeia β; usaram-se amostras de DNA_g, DNA_g+DNA_p (amostras #27⁺ e #28⁺) e DNA_p (controlos positivos).

Com este ensaio, pode-se confirmar que para a cadeia β as melhores quantidades de DMSO e MgCl₂ a utilizar eram 5% e 0,75mM, respectivamente, já que apenas nestas condições se verificou a amplificação, além do controlo positivo, dos fragmentos com DNA genómico e DNA plasmídico (amostras #27⁺ e #28⁺) – Figura 8. As amostras apenas de DNA genómico não amplificaram porque provavelmente os animais em estudo não eram transgénicos.

Apesar de se ter encontrado as concentrações óptimas de DMSO e MgCl₂ a usar para a cadeia β, quando se usaram as amostras de interesse para verificar se estas eram de animais transgénicos ou não, o PCR não funcionou. A inibição da reacção de polimerização pode ser devida à quantidade de DNA inserido na MasterMix. Como passo seguinte, quantificaram-se amostras a amplificar. Verificou-se que havia uma grande variação na quantidade de DNA de amostra para amostra. Cada reacção deve conter entre 100 – 200ng do DNA a amplificar. Assim, fizeram-se diluições das amostras de modo a que, a quantidade de DNA de cada amostra a amplificar estivesse entre os valores acima mencionados.

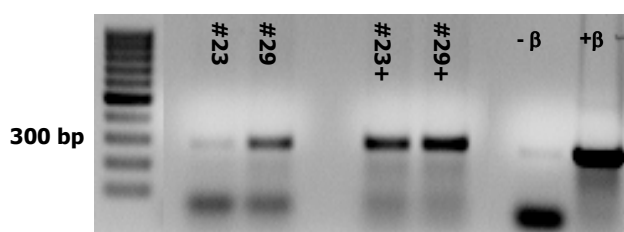


Figura 14 - Ensaio demonstrativo da amplificação de cerca de 100ng de DNA genómico, DNA genómico + DNA plasmídico (#23⁺ e #29⁺) e respectivos controlos positivo e negativo (cadeia β).

Com este ensaio verificou-se que realmente a quantidade de DNA pode limitar a reacção de amplificação, e que a melhor quantidade a usar é de cerca de 100ng.

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio anterior, repetiu-se o PCR para a cadeia β , usando uma amostra de DNAg diferente e uma amostra de um animal “Wild Type” (WT). Testaram-se estas amostras, com e sem 1 μ L de DNAp, e os respectivos controlos positivo e negativo para a cadeia β .

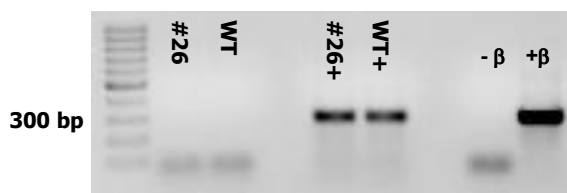


Figura 15 - Repetição do ensaio anterior para confirmação do resultado obtido; utilizou-se uma amostra de DNAg de um animal não transgénico, de um animal WT e estas duas amostras com 1 μ L de DNAp

Tal como era esperado, as amostras sem DNAp não amplificaram e as que continham 1 μ L de DNAp amplificaram. Assim, pode-se concluir que para a amplificação da cadeia β , é necessário usar 5% de DMSO, 0,75mM de MgCl₂ e cerca de 100ng de DNA. Além disso, a melhor temperatura de *annealing* é de 58°C e é necessário realizar 40 ciclos de amplificação. Foram assim encontradas as condições óptimas para a amplificação deste gene.

De seguida, optimizaram-se as condições do PCR para a cadeia α .

Começou-se por amplificar o gene da cadeia α com as condições óptimas encontradas para a cadeia β , ou seja, com 5% de DMSO, 0,75mM de MgCl₂, cerca de 100ng de DNA, 40 ciclos de amplificação e temperatura de *annealing* de 58°C. No entanto, verificou-se que estas

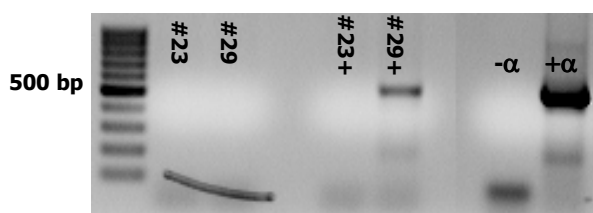


Figura 16 - Ensaio demonstrativo da amplificação de cerca de 100ng de DNA genómico, DNA genómico + DNA plasmídico e respectivos controlos positivo e negativo (cadeia α).

não eram ideais para a amplificação da cadeia α , já que nem todas as amostras com 1 μ L de DNAp amplificaram (Figura 16).

Como as condições de amplificação da cadeia β não eram as melhores para a amplificação da cadeia α , começou-se por testar 3 temperaturas de annealing: 56, 58 e 60°C.

Neste ensaio não houve amplificação de nenhuma das amostras de DNAg, mas as amostras com DNAp amplificaram, o que indica que o PCR funcionou, mas que as condições utilizadas não eram as ideais. Analisando a amplificação dos controlos positivos (DNAp), verificou-se que tanto a 56°C como a 58°C se obtiveram bandas muito semelhantes (optou-se por usar a $T_a = 58^\circ\text{C}$). A 60°C a banda era mais ténue, e por isso, esta não era a melhor temperatura a usar.

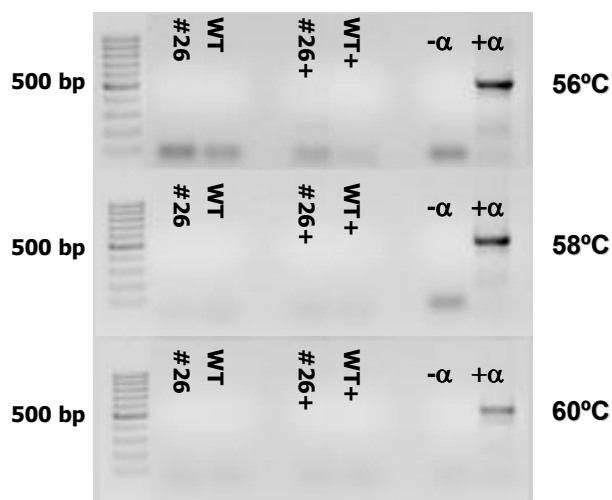


Figura 17 - Ensaio de 3 temperaturas de annealing na amplificação da cadeia α ; usaram-se amostras de DNAg (animal não transgénico e animal WT), amostras de DNAg + DNAp e respectivos controlos positivo e negativo.

De seguida, tal como se fez para a cadeia β , variou-se a concentração de MgCl_2 entre 0,5mM e 1mM, testando simultaneamente estas condições com 0% e 5% de DMSO, usando apenas amostras de DNA plasmídico.

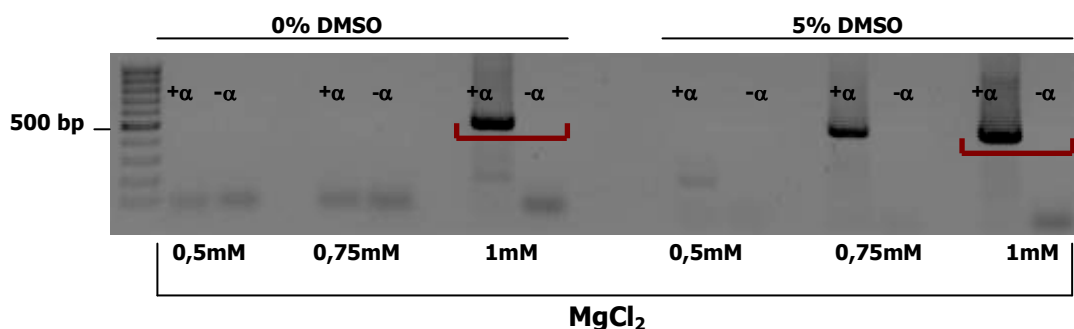


Figura 18 – Ensaio, em simultâneo, de duas concentrações de DMSO (0 e 5%) e de três concentrações de MgCl_2 (0,5mM, 0,75 e 1mM) para a amplificação dos fragmentos da cadeia α ; as amostras utilizadas foram de DNA plasmídico (controlos positivos do PCR)

Como se pode verificar pela análise da Figura 18, a cadeia α amplificou quando se utilizou 0,75 e 1mM de MgCl_2 . Analisando as concentrações de DMSO utilizadas, verificou-se que a cadeia α amplificou tanto com 0% de DMSO como com 5%, quando a concentração de MgCl_2 era de 1mM. Assim, poder-se-á concluir com este ensaio que a melhor quantidade de DMSO a usar é de 5% e a de MgCl_2 , 1mM.

Para confirmar estes resultados, testaram-se então estas condições para amostras de DNA genómico, com e sem o *construct* (DNAp). Como ainda haviam dúvidas de qual a melhor quantidade de MgCl₂ a utilizar, testaram-se ainda as amostras com 1,25mM de MgCl₂ (utilizando 5% de DMSO).

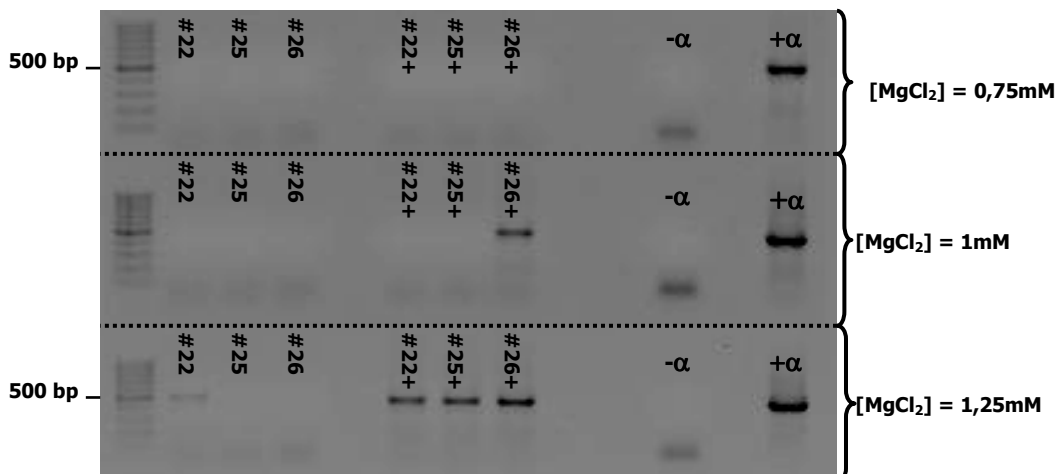


Figura 19 - Ensaio representativo da escolha da concentração óptima de MgCl₂ a utilizar para amplificação da cadeia α (com 5% de DMSO); neste ensaio utilizaram-se amostras de DNAg, DNAg+DNAp e DNAp (controles positivos).

Neste ensaio verificou-se que a melhor concentração de MgCl₂ a utilizar era 1,25mM, já que apenas com esta quantidade de MgCl₂ todas as amostras de DNAg+DNAp foram amplificadas (tal como o controlo positivo). Pode-se verificar ainda a amplificação da amostra de DNAg #22; no entanto, esta banda era muito ténue em relação às outras amplificadas, o que sugere que se tratava da amplificação do gene endógeno.

Repetiu-se o PCR com 5% de DMSO e 1,25mM de MgCl₂ para outras amostras, de forma a confirmar os resultados obtidos anteriormente. Como marcador de peso molecular, usou-se um produto de PCR do controlo positivo da cadeia α obtido anteriormente.

Como se pode verificar através da análise da Figura 20, foram encontradas as condições óptimas de

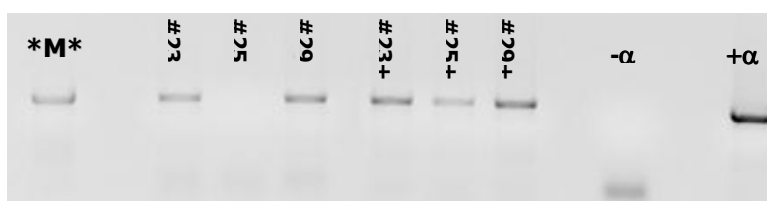


Figura 20 – Confirmação das condições de PCR para amplificação da cadeia α.

amplificação da cadeia α: 58°C de temperatura de *annealing*, 5% de DMSO e 1,25mM de MgCl₂.

As tabelas 5 e 6 mostram, em resumo, as condições pré e pós otimização do PCR para genotipagem da linha transgénica myc TCR.

Tabela 5 - Quantidades iniciais e optimizadas dos reagentes para preparação da MasterMix usada na PCR de genotipagem da linha de murganhos transgénicos myc TCR

Concentração stock	Reagentes	Concentração			
		Antes da optimização		Após Optimização	
		Cadeia α	Cadeia β	Cadeia α	Cadeia β
10x	Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1x	1x	1x	1x
10 mM	dNTPs	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
25 uM	MgCl ₂	0,75mM	0,75mM	1,25mM	0,75mM
50 pmol/uL	Primers	Sense	1 μ M	1 μ M	1 μ M
50 pmol/uL		Anti-Sense	1 μ M	1 μ M	1 μ M
--	H ₂ O (nuclease-free)	--	--	--	--
Puro	DMSO (5%)	0%	0%	5%	5%
5u/uL	Taq	0,05u/ μ L	0,05u/ μ L	0,05u/ μ L	0,05u/ μ L
Após optimização »100ng de DNA	DNA	?	?	100ng	100ng
Volume Total: 50 μL					

Tabela 6 - Condições de amplificação usadas antes e depois da optimização

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos
4	95	1x	4	95	1x
1	95	30x	1	95	40x
1	60		1	58	
1	72		1	72	
10	72	1x	10	72	1x
∞	4	∞	∞	4	∞

Condições pré-optimização

Condições pós-optimização

É de salientar a grande importância da realização de controlos positivos e negativos do PCR. Por exemplo, como foi mostrado na Figura 19, por vezes apareceram bandas ténues resultantes da amplificação do DNA genómico. Estando nós a avaliar a presença ou não de dois transgenes que codificam um TCR, em que cada indivíduo contém uma diversidade enorme do repertório de TCRs, é de esperar que os animais expressem genes similares aos transgénicos num pequeno número de linfócitos T. Ao contrário destes, os animais transgénicos apresentaram estes genes específicos em todas as suas células, pelo que é de esperar uma banda muito forte

como resultado de amplificação por PCR. Por esta razão, o controlo negativo apenas com DNA genómico e controlo positivo de DNA genómico juntamente com DNA plasmídico foram essenciais para permitir diferenciar a amplificação ténue, que correspondia ao gene endógeno, ou a forte amplificação correspondente à presença do transgene.

1.3) Estudo da expressão das cadeias α e β dos TCR's por citometria de fluxo

Apesar do PCR permitir verificar se os animais são ou não transgénicos, era importante saber se os genes de interesse estavam a ser expressos.

Para o estudo da expressão do gene $V\alpha 11$ utilizaram-se dois anticorpos: anti- $V\alpha 2$ e anti- $V\alpha 11$. Apesar deste não ser o gene de interesse, o anticorpo anti- $V\alpha 2$ permitiu verificar, de uma forma indirecta, se haveria expressão ou não do gene $V\alpha 11$ transgénico – se o animal expressasse o TCR transgénico ($V\alpha 11$) em todas as células, a percentagem normal de células T que expressavam $V\alpha 2$ deixaria de estar presente; caso contrário, se o animal não expressasse o gene $V\alpha 11$ transgénico, a expressão de $V\alpha 2$ seria a normal (% média de expressão de $V\alpha 2$ num animal não transgénico é \approx 13%).

A expressão de $V\alpha 2$ por parte dos animais em estudo mostrou ser a esperada num animal WT, ou seja, representava a expressão do gene endógeno de $V\alpha 2$. Este facto sugeriu que existia uma forte possibilidade dos animais transgénicos expressarem $V\alpha 11$. A Figura 16 mostra dois casos representativos da expressão de $V\alpha 2$, num animal transgénico e num animal não transgénico.

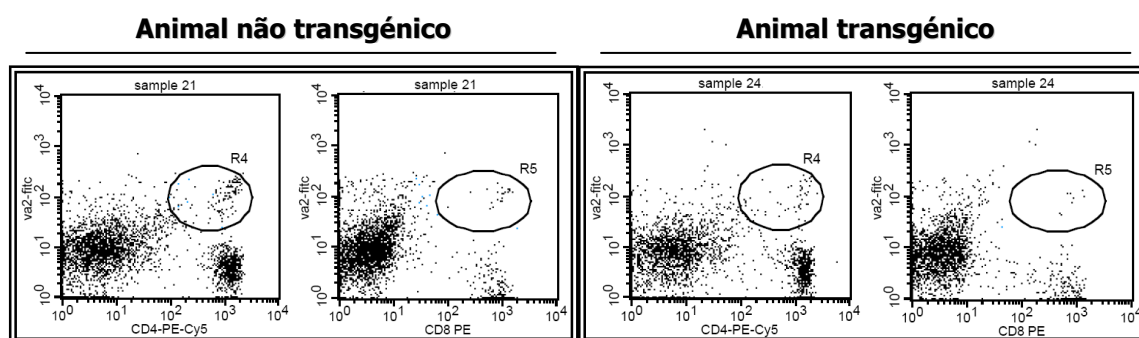


Figura 21 - Dois casos representativos da expressão de $V\alpha 2$ num animal transgénico (à direita) e num animal não transgénico (à esquerda; R4 – População de células $CD4^+ V\alpha 2^+$; R5 – População de células $CD8^+ V\alpha 2^+$).

Como se pode verificar, não existia uma grande diferença na expressão de $V\alpha 2$ dos animais transgênicos para os animais não transgênicos, já que a percentagem média de expressão de $V\alpha 2$ nos animais transgênicos era $\approx 16\%$ (dados em anexo – Anexo III).

Ao contrário do esperado, quando se efectuou o estudo da expressão de $V\alpha 11$ (com o anticorpo anti- $V\alpha 11$) verificou-se que a expressão deste gene, tanto nos animais transgênicos como nos não transgênicos, correspondia à expressão de $V\alpha 11$ de um animal normal, não transgênico (% normal de células $CD4$ que expressam $V\alpha 11 \approx 5-6\%$).

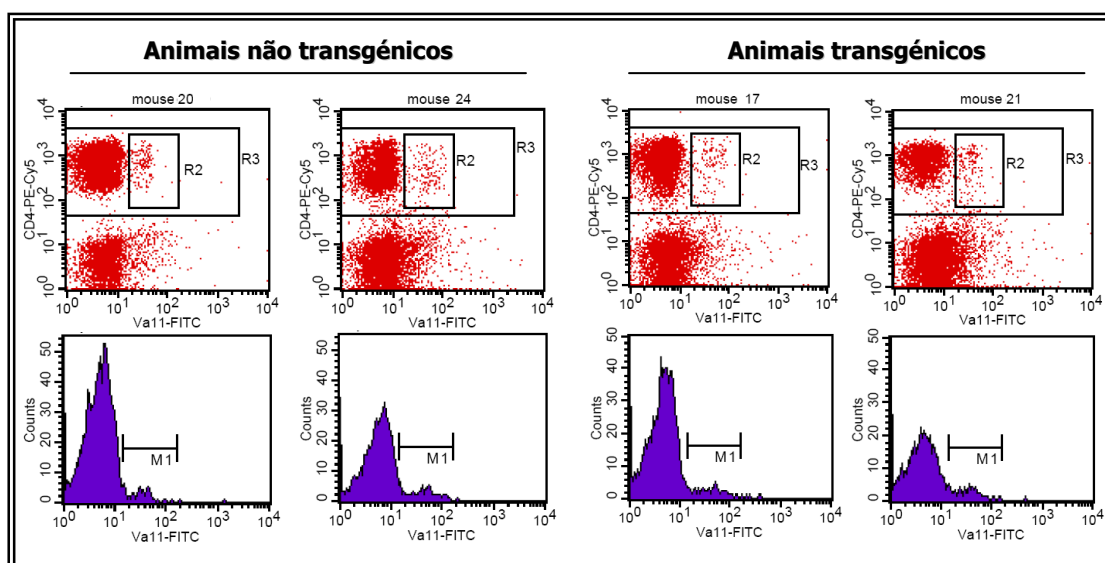


Figura 22 - Gráficos representativos da expressão de $V\alpha 11$ em animais transgênicos e não transgênicos; R3 – População total de células $CD4^+$, R2 – População de células $V\alpha 11^+$ dentro da população total de células $CD4^+$; M1 – População de células $V\alpha 11^+$.

Como se pode observar na figura 22, a expressão de $V\alpha 11$ é muito baixa, indicando que os animais apenas estavam a expressar o gene endógeno e não o transgene.

Através da análise do Gráfico 1, pode-se verificar que além da percentagem de células que expressam $V\alpha 11$ ser muito baixa para um animal transgênico (expressão normal de um animal WT), esta não variou dos animais transgênicos para

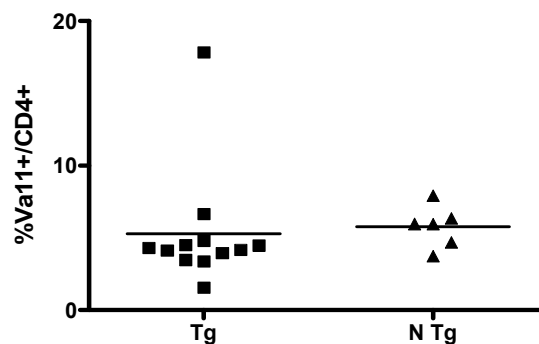
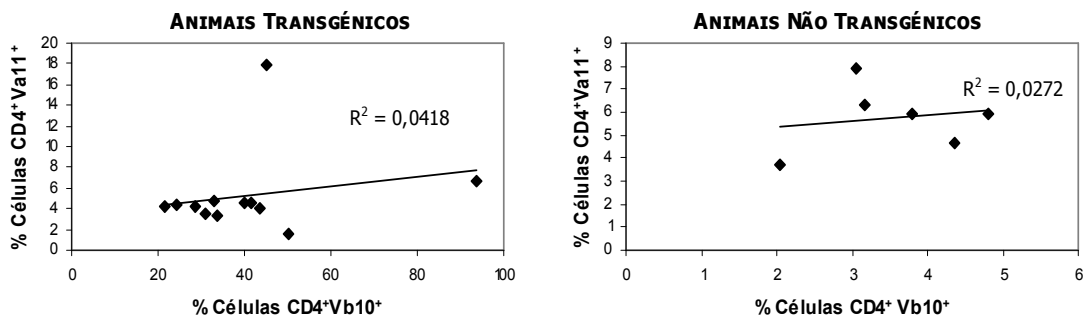


Gráfico 1 - Percentagem de células $V\alpha 11^+$ na população de células $CD4^+$ (Tg = Transgênico, N Tg = Não transgênico)

os não transgênicos – o valor médio de expressão foi sensivelmente o mesmo em ambos os grupos.



Gráficos 2 e 3 – Relação entre a expressão de $V\alpha 11$ e $V\beta 10$ nos animais transgênicos e não transgênicos.

Nos gráficos 2 e 3, pode-se verificar que ambas as linhas de tendência apresentaram um valor de R^2 muito baixo, e que por isso, apresentam um grande erro, ou seja, não existiu nenhuma relação entre a expressão de $V\alpha 11$ e $V\beta 10$ nos dois grupos de animais em estudo (transgênicos e não transgênicos).

Quanto à expressão de $V\beta 10$, observou-se que existiam três padrões de expressão:

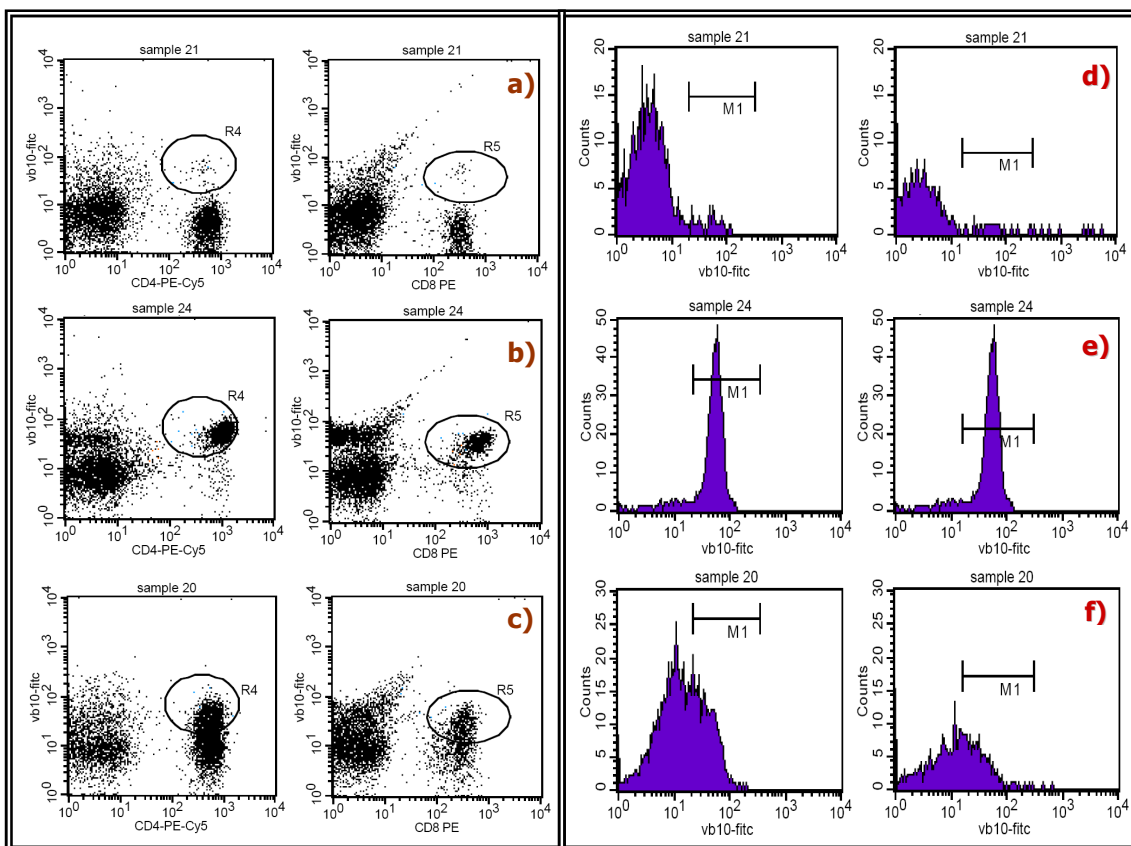


Figura 23 - Três padrões distintos da expressão de $V\beta 10$ nas células $CD4^+$ (R4) e $CD8^+$ (R5) em animais transgênicos e não transgênicos (à direita, histogramas de expressão de $V\beta 10$ nas células CD4 e CD8); a) e d) Expressão de $V\beta 10$ num animal não transgênico; Animais transgênicos com: b) e e) expressão homogênea de $V\beta 10$; c e f) expressão heterogênea de $V\beta 10$, na maioria dos linfócitos T.

Verificou-se que a expressão de V β 10 dentro das populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos animais não transgênicos variava entre 3-4%. Na figura 23b) pode-se observar que quase toda a população de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressaram V β 10, e que, por consequência, este animal, além de transgênico, expressa na quase totalidade das suas células T o gene V β 10. Verificou-se ainda que a maioria dos animais transgênicos para V β 10 apresentavam um padrão de expressão estranho, ou seja, não se conseguia fazer distinção da população de células positivas e negativas (Figura 23c).

Este padrão foi também observado nos histogramas de expressão de V β 10 destes animais - Figuras 23 d-f. Nos histogramas de expressão, foram consideradas positivas para V β 10 as células acima do valor 2×10^1 . No caso do animal não transgênico (Figura 23d) era bastante visível que apenas uma pequena percentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺) expressavam V β 10, já que se encontravam abaixo do valor estipulado anteriormente. Na figura 23e), tal como seria de esperar, observou-se que o pico de expressão de V β 10 era bem delimitado, já que praticamente todas as células T expressavam V β 10. No caso do animal transgênico, mas com expressão heterogênea, não se verificou uma distinção óbvia entre as células positivas e negativas, ou seja, as que expressavam e não expressavam V β 10 (Figura 23f).

Ao analisar as percentagens de células CD4⁺V β 10⁺ e CD8⁺V β 10⁺, verificou-se que estas mostravam diferenças significativas, quando se agrupavam os animais transgênicos e os não transgênicos. Para ter uma melhor percepção desta diferença, calculou-se a razão entre as percentagens de células CD4⁺ e CD8⁺.

Verificou-se então que, a razão CD4/CD8 nos animais transgênicos para V β 10 era, em média, 5 e que nos animais não transgênicos era, em média, 2. Isto significa que

Tabela 7 - Valores médios das percentagens de células CD4, CD8, CD4 V β 10⁺, CD8 V β 10⁺ e razão média CD4/CD8, e respectivos desvios padrão e limites superior e inferior, em animais transgênicos e não transgênicos

		%CD4 ⁺	%CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	%V β 10 (nas CD4 ⁺)	%V β 10 (nas CD8 ⁺)
Animais Transgênicos	Média	45,27	15,77	3,06	40,47	51,29
	Desvio padrão	12,9	3,66	1,29	18,83	16,55
	Limite Superior	63,15	22,50	6,23	93,59	94,92
	Limite inferior	23,65	8,88	1,37	21,52	29,68
Animais Não Transgênicos	Média	25,72	13,78	1,89	3,54	4,21
	Desvio padrão	7,66	3,78	0,39	0,99	1,32
	Limite Superior	38,18	20,03	2,43	4,81	5,77
	Limite inferior	16,60	9,09	1,31	2,05	1,83

os animais transgênicos apresentavam uma razão entre as células CD4/CD8 cerca de 2,5 vezes superior à razão destas mesmas células nos animais não transgênicos

A partir destes resultados, foram escolhidos 2 grupos de animais: 12 transgênicos e 6 não transgênicos. Todos os estudos efectuados posteriormente só abrangeram estes dois grupos.

1.4) Estudo da resposta à infecção por *M. avium* de murganhos transgênicos (mycTCR)

Apesar dos animais apenas expressarem o gene $V\beta 10$ e não $V\alpha 11$ (transgene), decidiu-se estudar a resposta que estes animais apresentavam quando a infecção por *M. avium*. Para isso, 6 animais transgênicos e 6 animais não transgênicos foram infectados com $5,4 \times 10^5$ CFUs da estirpe *M. avium* 2447. Os restantes 6 animais transgênicos não foram infectados. Após 11 e 25 dias de infecção foram avaliados os marcadores de activação - CD44 e CD62L – e CD19 (células B) no sangue periférico dos três grupos de animais. Com esta experiência pretendeu-se verificar se a presença da cadeia $V\beta 10$ favorecia o reconhecimento das células infectadas, já que uma maior activação ou uma activação mais rápida destes marcadores seria indicativo que estas células reconheceriam melhor as células infectadas.

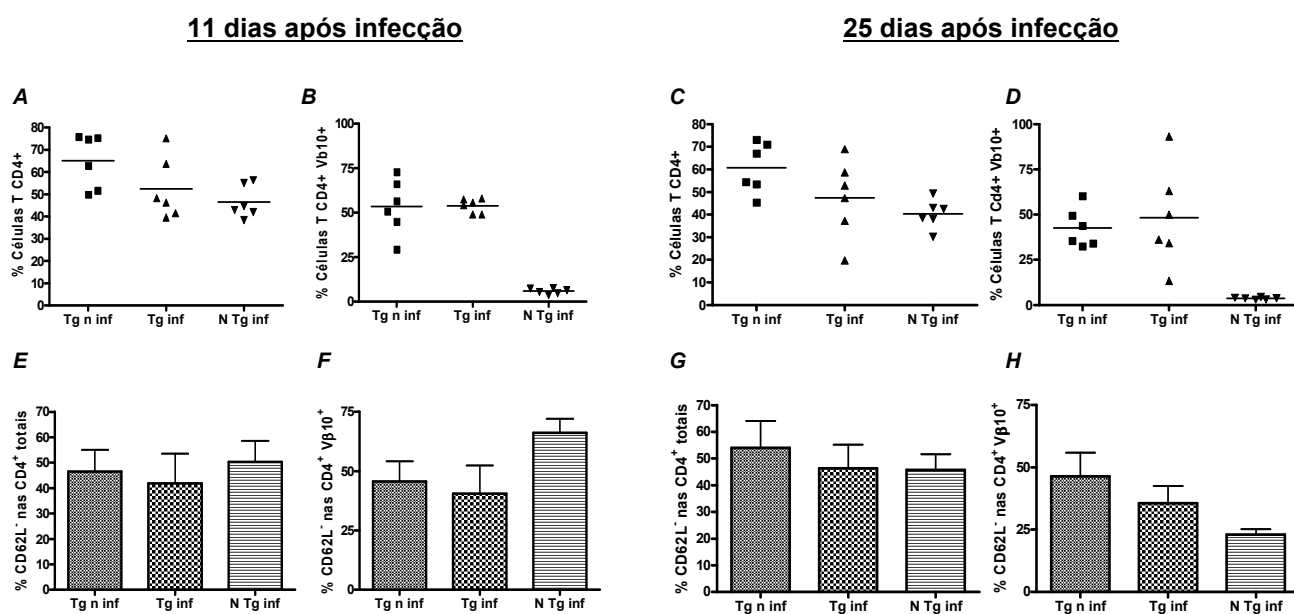


Figura 24 – Comparação da expressão de células T CD4⁺ (A e C), CD4⁺ V β 10⁺ (B e D), CD62L^{neg} nas populações de células T CD4⁺ totais (E e G) e CD4⁺ V β 10⁺ (F e H), após 11 e 25 dias de infecção; Tg n inf = Transgênico não infectado, Tg inf = Transgênico infectado e N Tg inf = Não transgênico infectado.

Como se pode verificar na figura 24, tanto aos 11 como aos 25 após infecção, os animais transgénicos não infectados apresentavam uma percentagem de células T CD4⁺ superior à dos outros dois grupos de animais. Enquanto que a percentagem de células CD4⁺ Vβ10⁺ nos animais transgénicos não infectados diminuiu após 25 dias de infecção, esta percentagem manteve-se mais ou menos constante nos animais transgénicos infectados. Tal como esperado, a percentagem de células T CD4⁺ Vβ10⁺ nos animais não transgénicos era praticamente nula nos dois tempos de infecção.

Quanto à expressão de CD62L^{neg} dentro das células T CD4⁺, verificou-se um pequeno aumento da expressão tanto nos animais transgénicos infectados como nos não transgénicos infectados. Quando se analisou esta expressão dentro das células T CD4⁺ Vβ10⁺, verificou-se uma pequena diminuição de expressão de CD62L^{neg} nos animais transgénicos infectados e uma grande diminuição nos animais não transgénicos infectados. Os animais transgénicos não infectados também apresentaram uma ligeira diminuição da expressão de CD62L^{neg}.

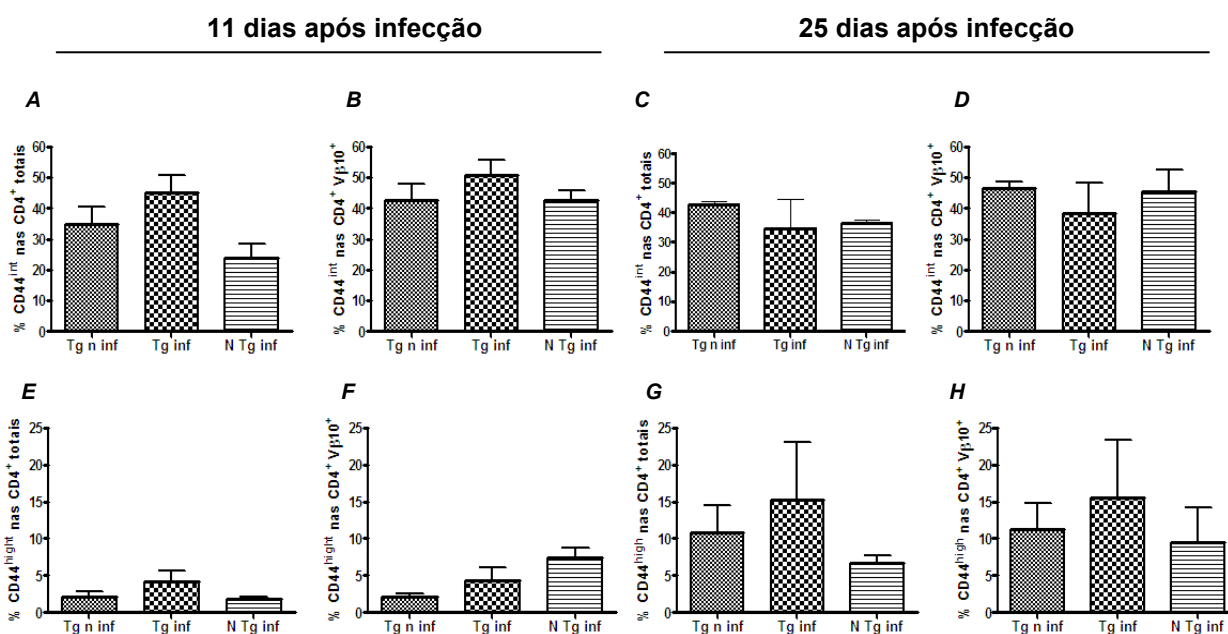
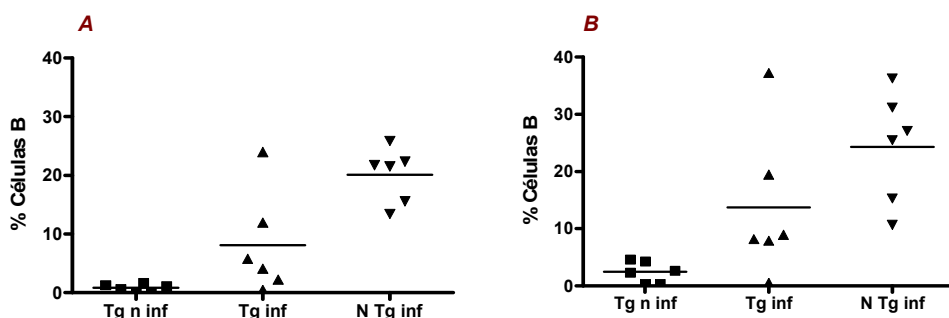


Figura 15 – Comparação da expressão de CD44^{int} nas populações de células T CD4⁺ totais (A e C) e CD4⁺ Vβ10⁺ (B e D) e CD44^{high} nas populações de células T CD4⁺ totais (E e G) e CD4⁺ Vβ10⁺ (F e H) após 11 e 25 dias de infecção; Tg n inf = Transgénico não infectado, Tg inf = Transgénico infectado e N Tg Inf = Não transgénico infectado.

Através da análise da figura 25 pode-se verificar que houve um aumento de expressão de células T CD4⁺ com fenótipo CD44^{int} (células activadas) tanto nos animais transgénicos não infectados como nos animais não transgénicos infectados, após 25 dias de infecção. No entanto, não se verificou este aumento de expressão de células activadas CD44^{int} nos animais transgénicos infectados. Este padrão de

expressão de CD44^{int} após 25 dias de infecção (comparativamente aos 11 dias após a infecção) também foi observado na população de células T CD4⁺ Vβ10⁺. Quanto à expressão de CD44^{high}, verificou-se um aumento considerável de expressão destas células de memória activadas em todos os grupos de animais, dos 11 dias para os 25 dias após a infecção, tanto na população de células T CD4⁺ como na de células T CD4⁺ Vβ10⁺. Este aumento foi bastante visível principalmente nos animais transgénicos infectados (Figura 25 E,F,G e H).



Gráficos 4 e 5 – Comparação da percentagem de células B (CD19) 11 dias (A) e 25 dias (B) após infecção, nos animais transgénicos infectados, transgénicos não infectados e não transgénicos infectados

Pela a análise dos gráficos 4 e 5, pode-se verificar que houve um aumento da percentagem de células com fenótipo CD19 (células B) nos animais infectados (transgénicos e não transgénicos) 25 dias após infecção. Tal como esperado, nos animais não infectados não se verificou esse aumento.

Assim, apesar de não se observarem diferenças na resposta à infecção através da quantificação do marcador de activação CD62L, quando se quantificou o marcador de activação CD44 verificaram-se algumas diferenças, podendo este facto indicar um favorecimento da presença da cadeia β transgénica nos TCRs no reconhecimento e resposta à infecção por *M. avium*.

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

Sabe-se que as células infectadas por estas bactérias são essencialmente macrófagos. No entanto, há indicações que as células dendríticas e neutrófilos são também infectados por micobactérias. Saber exactamente que células são infectadas por *M. avium* pode ajudar a compreender melhor a resposta imunitária nos diferentes órgãos e ainda ajudar a compreender como é que a infecção se dissemina dos órgãos inicialmente infectados para outros. Trabalho realizado no laboratório do ICVS mostrou que o timo é um dos órgãos alvos da infecção por micobactérias (Nóbrega *et al.*, 2007). Neste caso, saber quais são exactamente as células infectadas poderá ajudar a compreender como é que este órgão é colonizado por bactérias ao longo da infecção, porque é que a resposta imunitária ocorre claramente mais tarde do que em outros órgãos e ainda o possível impacto desta infecção na diferenciação de linfócitos T.

2.1) Imunofluorescência: marcação de macrófagos e micobactérias

O objectivo da utilização desta técnica foi marcar macrófagos de timos infectados com micobactérias, para identificar as células infectadas com *Mycobacterium avium* neste tecido.

Para verificar a marcação do anticorpo anti-F4/80 (marcação de macrófagos), utilizaram-se inicialmente cortes de timo de ratinho não infectados.

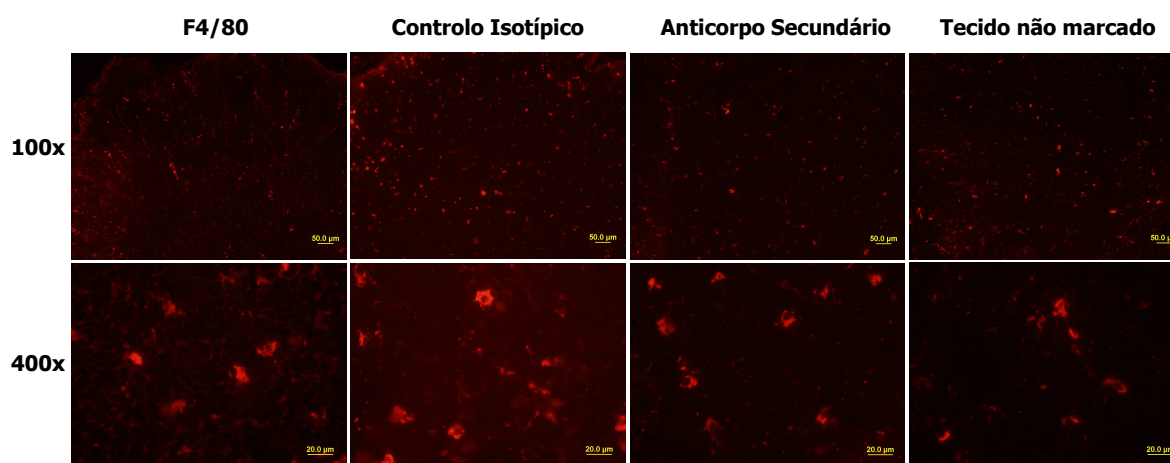


Figura 26 - Imunofluorescência para marcação de F4/80 (macrófagos) em timo de ratinho não infectado (fotografias tiradas em microscópio de fluorescência com filtro TRITC - vermelho)

Os resultados obtidos por observação ao microscópio de fluorescência sugerem que a técnica de imunofluorescência não funcionou bem. Através da análise

da Figura 26, pode-se verificar que existia muito *background*, ou seja, não se observaram praticamente quaisquer diferenças entre as lâminas com a marcação pretendida e os controlos (isotípico, apenas com anticorpo secundário e sem anticorpos). Em relação ao tecido não marcado com nenhum anticorpo observou-se uma ligeira diferença na marcação. O bloqueamento não estava a ser suficientemente eficaz, e o tecido apresentou autofluorescência.

Para tentar resolver os problemas encontrados no ensaio anterior, foi utilizada uma solução de bloqueamento com 4% de soro de cabra e 4% de BSA. No entanto, por erros de diluição, utilizou-se uma solução de bloqueamento com 2% de soro de cabra e 2% de BSA.

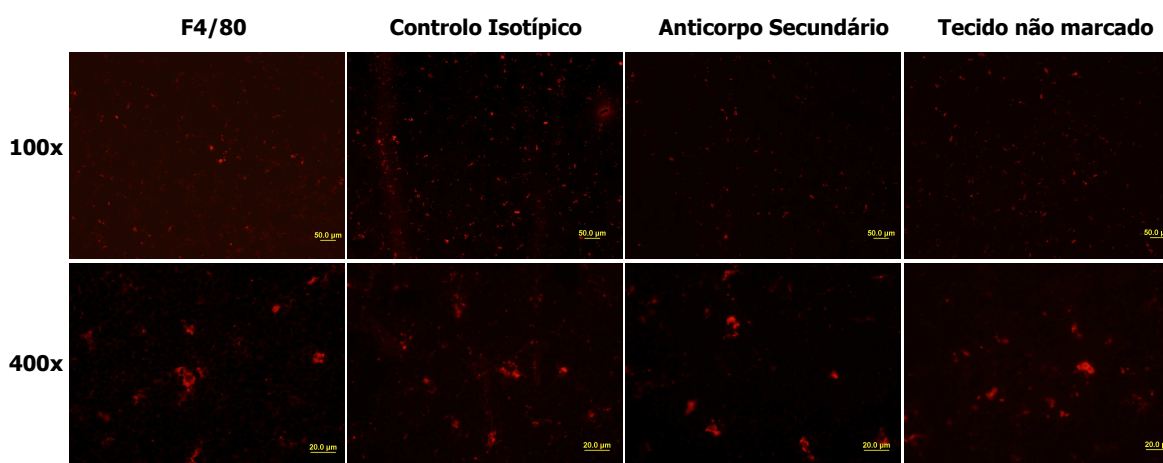


Figura 27 - Imunofluorescência para marcação de F4/80 (macrófagos) em timo de ratinho não infectado após alteração efectuada na solução de bloqueio de ligações inespecíficas (fotografias tiradas em microscópio de fluorescência com filtro TRITC - vermelho)

Através da análise das lâminas no microscópio de fluorescência (Figura 27), observou-se que o *background* tinha sido reduzido significativamente, apesar de ter havido um engano na preparação de bloqueamento. Puderam-se observar, no entanto, macrófagos em todas as lâminas (com marcação para F4/80, controlo isotípico, controlo só com anticorpo secundário e tecido não marcado). Este resultado deveu-se à autofluorescência dos macrófagos.

Como no ensaio anterior se conseguiu reduzir bastante o *background*, passou-se para a marcação de timos de murganhos C57BL/6 infectados com *Mycobacterium avium* (26wpi). Iniciou-se então a marcação dupla: macrófagos, a vermelho, e micobactérias a verde. Neste ensaio deixou-se de fazer o controlo isotípico e passou-se a usar apenas os controlos de tecido infectado só com anticorpo secundário e tecido não infectado (com as mesmas marcações testadas para o tecido infectado).

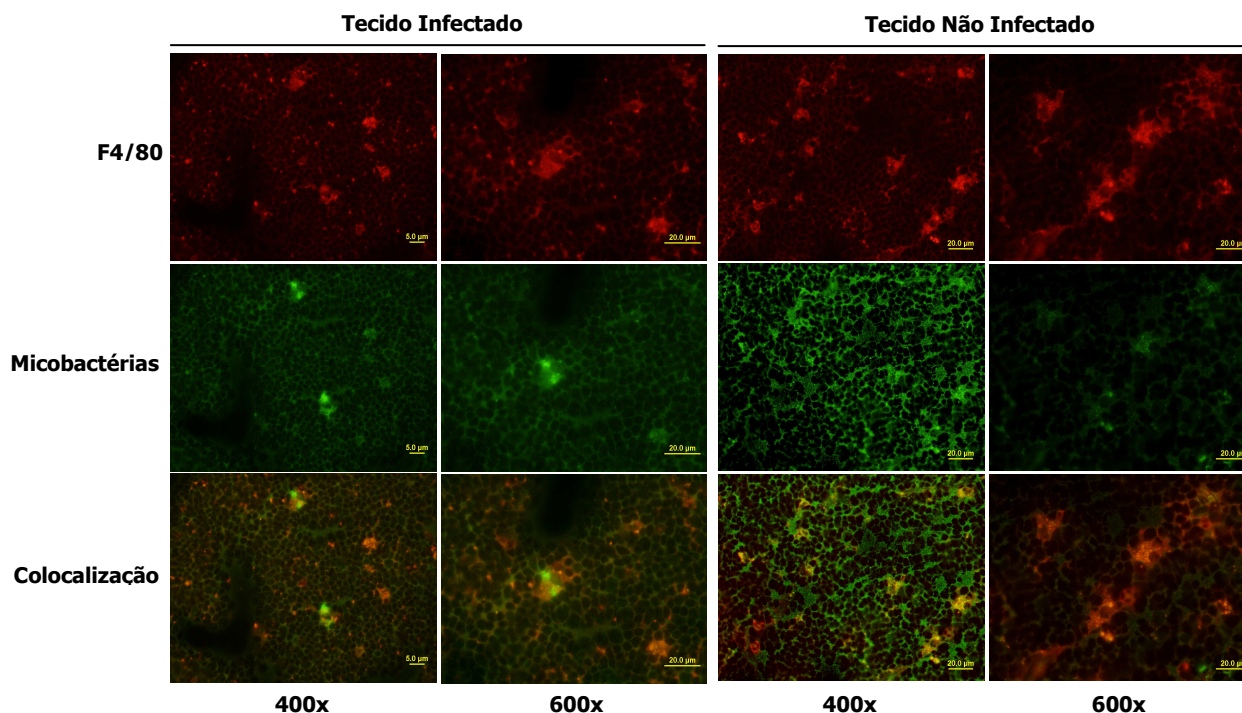


Figura 28 – Marcação de macrófagos (a vermelho) e micobactérias (a verde) em timo de murganho 26wpi; a colocalização das imagens indica uma possível marcação de micobactérias dentro dos macrófagos (amarelo)

Na observação das imagens da colocalização das duas marcações, puderam-se observar macrófagos apresentarem-se corados de verde-amarelado, o que em princípio é sinal de marcação de macrófagos infectados. No entanto, os resultados da marcação a verde e a vermelho eram muito semelhantes e não foram encontradas formas bacilares. A marcação para as micobactérias apresentou também muito *background*.

Os resultados obtidos anteriormente conduziram a algumas alterações nas etapas do procedimento, na tentativa de reduzir o *background* observado no ensaio anterior. O tempo de fixação com acetona foi reduzido para 5 minutos e feito em tina (anteriormente a acetona era aplicada directamente sobre as lâminas). Alguns tempos de lavagens foram alterados, a solução de bloqueamento passou a ser PBS 0,05% Tw20 com 10% de soro de cabra.

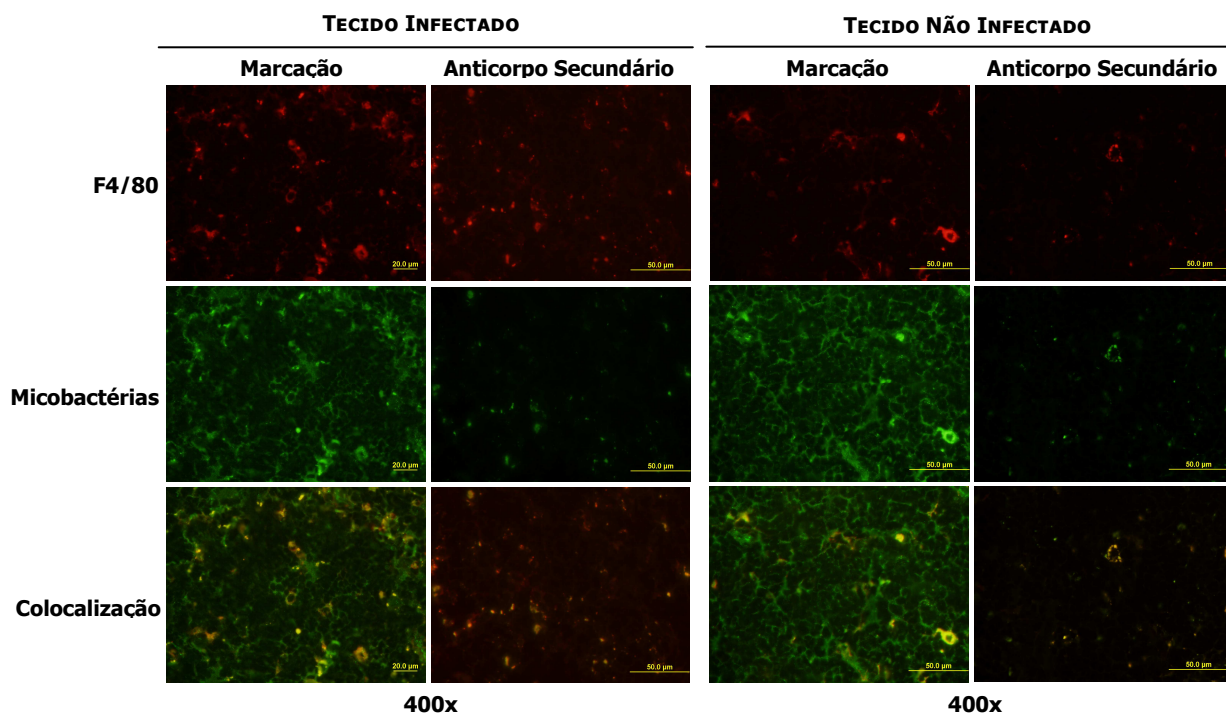


Figura 29 - Marcação de macrófagos (a vermelho) e micobactérias (a verde) em timo de murganho 26wpi, após alterações no protocolo; a colocalização das imagens indica uma possível presença de micobactérias dentro dos macrófagos (amarelo).

As primeiras fotografias tiradas resultaram em resultados discrepantes que poderão ser explicados pelo facto de ter sido usado o ajustamento automático do tempo de exposição das fotografias. Para ultrapassar esta situação, tiraram-se novas fotografias, mas fixando os tempos de exposição, tendo-se obtido uma redução significativa do *background*, observado no ensaio anterior.

a) Autofluorescência dos macrófagos

Apesar do problema do *background* parecer estar resolvido (exceptuando o de autofluorescência), continuou a haver uma grande dificuldade em distinguir células infectadas e não infectadas. Segundo os resultados observados, qualquer macrófago marcado a vermelho fluoresce a verde (ou mesmo utilizando qualquer outro filtro de luz). A fluorescência a verde (autofluorescência) indica que todos os macrófagos do tecido estão infectados, o que não corresponde à realidade, já que foram observados tecidos não infectados. Observando uma lâmina corada com Zielh-Nielson (coloração para micobactérias observável em campo claro), pode-se constatar que existia uma grande concentração bacteriana, resultado este esperado já que o timo foi extraído 26 semanas após a infecção. No entanto, as micobactérias encontravam-se agrupadas em determinadas zonas do tecido.

Foi também observada a presença de macrófagos marcados a verde no tecido não infectado tratado com os anticorpos primário e secundário para marcação de micobactérias. Todos estes dados sugerem que grande parte da marcação a verde (micobactérias) nos macrófagos se deve à autofluorescência destas células.

A autofluorescência demonstrou ser um difícil de eliminar, especialmente em tecidos infectados (tendo sido publicado mais tarde um artigo a relatar este facto em tecidos infectados com *M. tuberculosis*, Scott-Browne *et al.*, 2007), impossibilitando a continuidade da aplicação da técnica de imunofluorescência.

2.2) Imunohistoquímica: marcação de macrófagos e *M. avium* em tecidos infectados

A imunohistoquímica, ao contrário da imunofluorescência, não apresentou problemas como a autofluorescência e forneceu resultados mais directos e facilmente interpretáveis em relação às diluições dos anticorpos usadas e os bloqueios realizados.

a) Optimização da marcação de micobactérias

Nesta fase, utilizaram-se tecidos diferentes (timo e outros órgãos), já que se iam fazer ensaios de várias condições, de modo a encontrar as condições óptimas de marcação para posteriormente aplicá-las em imunofluorescência.

Começou-se por usar blocos de parafina com fígado de murganho infectado (12wpi) e blocos com pulmão, fígado, baço e timo não infectados, como controlo negativo. Testou-se um novo bloqueio com *anti-Fc Receptor*, já que se suspeitava que o background era devido ao anticorpo primário e o

Antigen Retrieval (recuperação de epítopes) com solução de citrato de sódio 10mM 0,05% Tw20 porque se passou para blocos de parafina. A preparação de tecidos para realizar técnicas de imunohistoquímica faz-se, na maioria dos casos, por fixação dos tecidos em formalina e posterior inclusão em parafina. A grande vantagem desta técnica de preparação de tecidos, em relação à técnica de congelação, é o facto de preservar melhor a estrutura dos tecidos. A desvantagem é o facto de frequentemente ocorrer a perda dos epítopes reconhecidos pelos anticorpos. Este problema deve-se

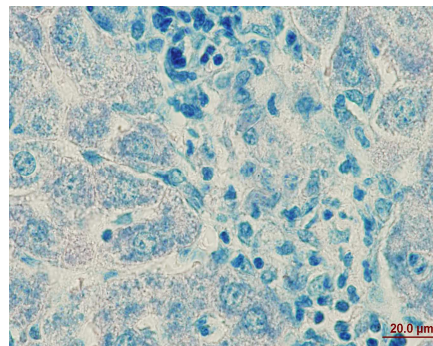


Figura 30 - Coloração de Ziehl-Neelson de fígado de murganho 12 semanas após infecção; a presença de micobactérias não é evidente (ampliação:600x)

principalmente ao facto do antígeno ter assumido uma conformação diferente aquando a fixação e/ou da inclusão em parafina e por isso o anticorpo é incapaz de o reconhecer. Assim, o primeiro passo a realizado foi testar técnicas de *antigen retrieval*, ou seja, técnicas que permitem recuperar os epítomos perdidos durante o processamento dos tecidos.

Como neste ensaio se pretendiam marcar micobactérias foi efectuado outro controlo através da coloração de Ziehl-Neelson.

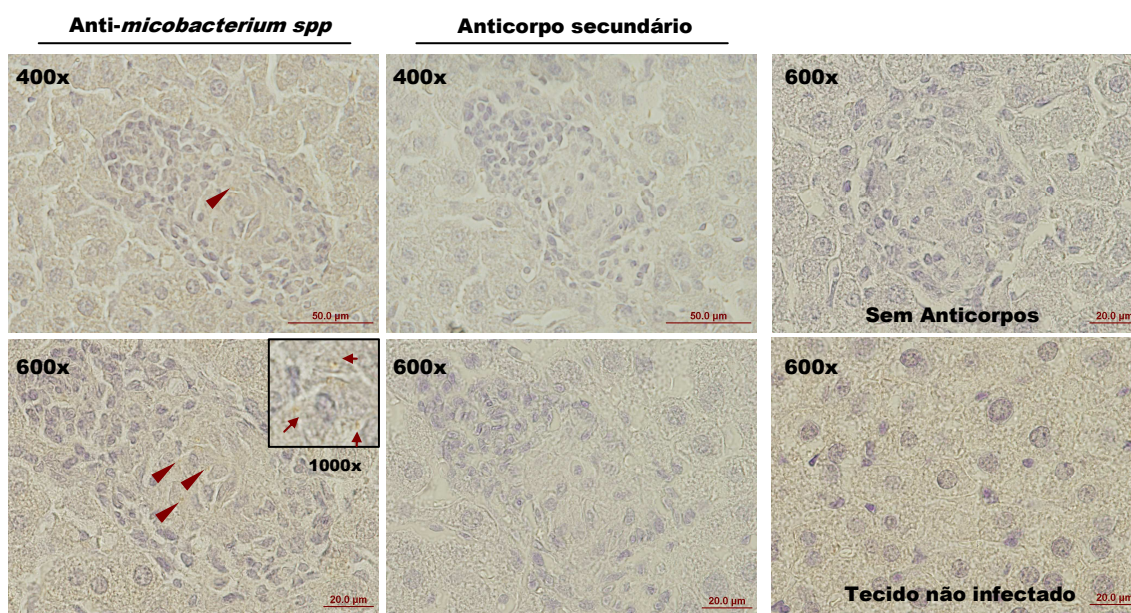


Figura 31 – Imunohistoquímica para marcação de micobactérias num fígado de murgancho com 12 semanas de infecção; as setas indicam uma possível presença de micobactérias

Observando a lâmina submetida à coloração de Ziehl-Neelson (ZN) – Figura 30, constatou-se que era difícil encontrar micobactérias isoladas; no entanto observaram-se vários granulomas. Este facto deve-se provavelmente ao pouco tempo de infecção.

Quanto às marcações por técnicas de imunohistoquímica, ficaram muito escuras devido ao tempo excessivo de revelação em Diaminobenzidina (DAB), o que dificultou a percepção do que realmente era marcação ou não. No entanto, foi possível observar uma marcação castanha muito ténue na zona dos granulomas. É provável que esta seja marcação indique a presença de micobactérias.

Nas lâminas que receberam apenas anticorpo secundário, o tecido apresentava-se mais claro e nos granulomas não se encontrava qualquer marcação. Este resultado sugere que o anticorpo secundário está a ligar-se correctamente, e que, a marcação em excesso observada na lâmina com a marcação desejada (micobactérias) possa ser devido a ligações inespecíficas do anticorpo primário. Para

confirmar este resultado, utilizou-se uma lâmina que não foi marcada (sem anticorpos) na qual se observou uma cor ligeiramente acastanhada devido ao excesso de tempo em que foi submetida ao DAB.

Apesar do excesso de marcação (inespecífica) por parte do anticorpo primário, não se justificava diminuir a sua concentração, já que a marcação verdadeira (específica) se apresentava muito ténue. Assim, testou-se uma concentração superior de anticorpo primário (1/50), para ver se se conseguia aumentar a marcação específica. Considerando que o ensaio anterior possa não ter funcionado bem devido ao método de recuperação de epítopes usado, utilizou-se uma solução comercial, segundo as indicações do fornecedor. Como foi difícil identificar as micobactérias quer pela coloração de ZN quer pela marcação por imunohistoquímica, usaram-se cortes com maior concentração bacteriana (animal INF- γ KO 8wpi; este animal não produz IFN- γ , uma citocina de grande importância para a resposta à infecção por micobactérias). Com este procedimento pretendeu-se verificar se a marcação era muito ténue pela fraca concentração bacteriana ou pelo anticorpo.

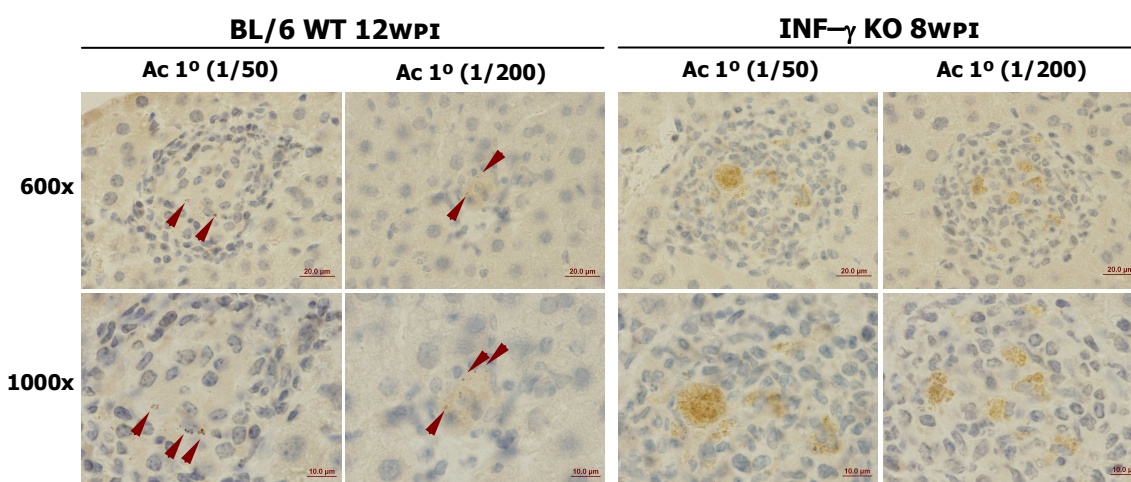


Figura 32 - Ensaio de duas concentrações de anticorpo anti-*mycobacterium spp* (anticorpo primário) num animal WT com 12 semanas de infecção e num animal INF- γ KO (8wpi). As setas indicam uma possível marcação de micobactérias.

Comparando as duas diluições do anticorpo primário para marcação de micobactérias nos tecidos do animal WT com 12 semanas de infecção, verificou-se que havia mais marcação nos tecidos marcados com o anticorpo primário diluído de 1/50, apesar desta marcação também ser observável quando a diluição do anticorpo era de 1/200. Havia mais *background* nas preparações marcadas com o anticorpo menos diluído, mas este não mascarou a verdadeira marcação. Nos tecidos do animal INF- γ KO, não se conseguiu distinguir o que realmente era marcação; eram visíveis muitas vesículas de cor amarela nos granulomas, que se pensa que possa ser

material fagocitado pelos macrófagos. No entanto, não foi observada nenhuma marcação semelhante à encontrada no animal WT (possível marcação de micobactérias). Também nos tecidos do animal IFN- γ KO, não se observou nenhuma diferença clara entre a marcação com as duas diluições do anticorpo primário.

Nos tecidos do animal WT que apenas levaram anticorpo secundário, não se observou qualquer marcação. No entanto, no animal IFN- γ KO, continuaram-se a observar vesículas amarelas. O mesmo aconteceu nas preparações de tecidos deste animal que não levaram anticorpos. Este resultado, observado em todos os granulomas dos tecidos do murganho, poderá significar que esta coloração de tom amarelo-acastanhado (devido a uma reacção inespecífica com o DAB do material que se encontrava no interior destas vesículas) deveu-se provavelmente à técnica de *Antigen Retrieval* utilizada, o que pode induzir em erro na classificação de marcação específica e não específica do tecido. Pode-se dizer também que, este aparecimento das vesículas não se devia a um problema com os anticorpos já que o tecido não infectado (controlo negativo) não apresentava granulomas nem qualquer marcação, tal como esperado.

Estes resultados e os obtidos anteriormente, sugerem que o *Antigen Retrieval* feito com a solução comercial é mais eficiente no caso dos tecidos do animal WT (12wpi) que o tampão citrato preparado no laboratório. No entanto, na preparação de tecidos do animal IFN- γ KO esta solução comercial poderá dar falsos positivos de marcação específica.

b) Optimização da marcação de macrófagos

De seguida, pretendeu-se marcar macrófagos em tecidos infectados. Utilizou-se o *Antigen Retrieval* (solução comercial), uma solução de bloqueio com anti-Fc receptor (0,5 μ g/mL) e soro de cabra a 10%. As diluições dos anticorpos foram as anteriormente utilizadas em imunofluorescência. No entanto, não se observou qualquer marcação para F4/80.

Para tentar resolver o problema, optou-se por não fazer *Antigen Retrieval* e como o anticorpo secundário era feito em coelho, usou-se 10% de BSA e anti-Fc Receptor (1/1000) como bloqueio. Quanto aos anticorpos, aumentou-se a concentração tanto do anticorpo primário como do anticorpo secundário exageradamente (1/50) para ver se assim se conseguia alguma marcação. Neste ensaio usaram-se vários tecidos: pulmão, fígado, baço e timo, de um animal sem células T, após 8 semanas de infecção (animal com uma elevada concentração bacteriana).

No fígado observou-se uma marcação forte de F4/80 nos granulomas. Observou-se também a marcação de células de Kupfler (células precursoras de macrófagos no fígado). Verificou-se que existia algum *background*, devido à concentração muito alta de anticorpos utilizada (diluição de 1/50), já que os controlos de tecido só com anticorpo secundário e sem anticorpos se apresentavam limpos. No baço, observou-se muita marcação de F4/80 na zona cortical. No timo, a marcação observada era fraca, e não se conseguiu distinguir ao certo se era marcação específica de F4/80. No pulmão também se observou alguma marcação.

c) Imunohistoquímica e Zhiel-Neelson: marcação de macrófagos (IHC) e micobactérias (ZN)

Como a marcação dos macrófagos funcionou bem, aplicou-se a coloração de Ziehl-Neelson por cima da marcação de F4/80 realizada anteriormente, de modo a verificar se as micobactérias se encontravam nas zonas marcadas por imunohistoquímica, ou seja, dentro dos macrófagos.

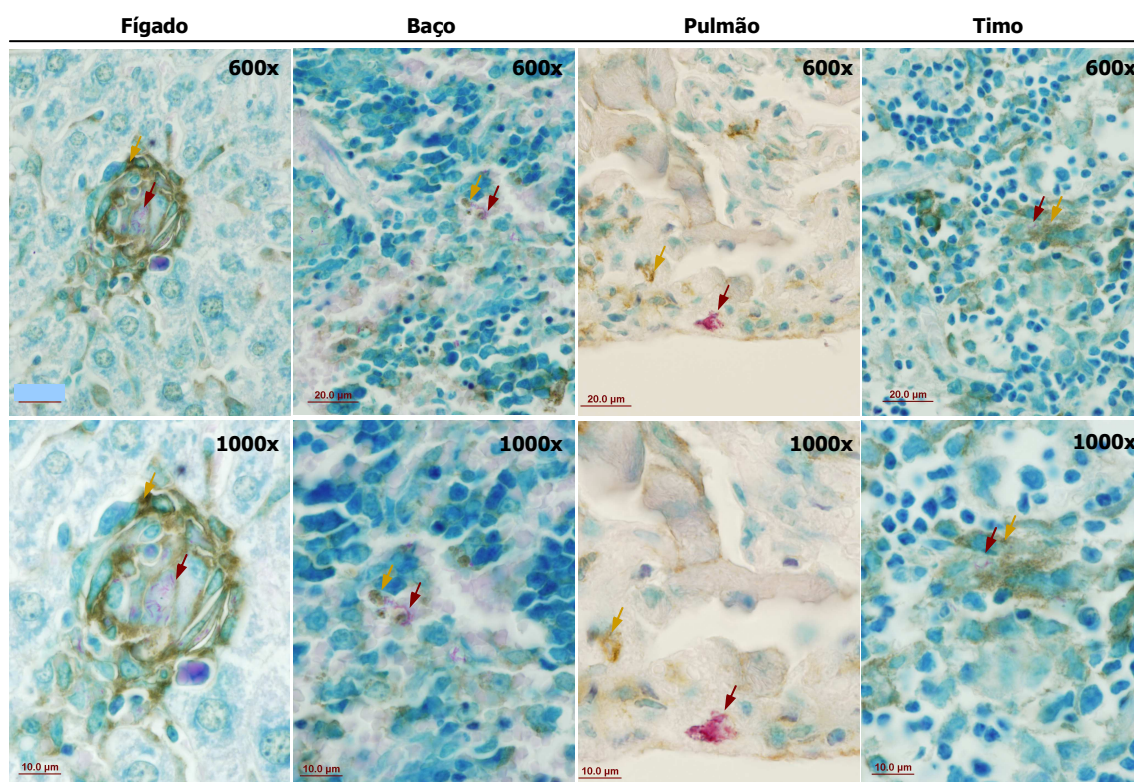


Figura 33 - Marcação de macrófagos por imunohistoquímica e de micobactérias (*M. avium*) por coloração de Ziehl-Neelson; as setas amarelas indicam a marcação de macrófagos e as vermelhas a marcação de micobactérias.

Como se pode verificar na figura 33, as micobactérias localizavam-se dentro dos macrófagos. Este facto foi facilmente observado no fígado, mas não se apresentou tão evidente nos restantes tecidos. Enquanto que a marcação era

extremamente evidente para macrófagos no fígado infectado, no timo, esta marcação era menos clara. Por outro lado, a marcação de micobactérias também é mais facilmente detectadas nuns órgãos do que noutros. Mais uma vez, no fígado, em que as micobactérias se encontram essencialmente no interior de granulomas muito bem definidos, estas são muito facilmente detectadas. No timo, não só a marcação dos macrófagos foi menos clara como também a das micobactérias. Existem evidências de que as micobactérias em estado latente podem não corar com a coloração de Ziehl-Neelson, podendo este facto explicar a diferença de marcações observadas em cada órgão.

Assim, conseguiu-se estabelecer a marcação por imunohistoquímica para marcação de macrófagos, juntamente com a coloração de Ziehl-Neelson, para marcação de micobactérias (neste caso, *M. avium*).