

Anexo I - Protocolos

Citometria de fluxo

1. Adicionar 1000uL de ACK ao sangue recolhido e incubar 10min @ RT;
2. Centrifugar durante 5min @ RT a 1200rpm; rejeitar o sobrenadante;
3. Ressuspender as células em 200uL de FACS wash;
4. Colocar as células numa placa de ELISA de 96 poços de fundo redondo;
5. Centrifugar as células durante 2min @ 4°C a 1200rpm; rejeitar o sobrenadante;
6. Diluir os anticorpos em FACS wash, mantendo os mesmos em gelo, protegidos da luz;
7. Agitar cuidadosamente a placa para descolar as células do fundo dos poços;
8. Adicionar o anticorpo primário (50uL de anti-V α 2, 20uL de anti-V α 11 ou 50uL de anti-V β 10) e incubar durante 20 minutos no gelo;
9. Lavar as células uma vez:
 - a. Adicionar 200uL de FACS wash;
 - b. Centrifugar as células durante 2min @ 4°C a 1200rpm; rejeitar o sobrenadante;
10. Adicionar 25uL de anticorpo secundário (Goat anti-rat FITC) e incubar durante 20min no gelo, protegido da luz;
11. Lavar as células 2x (2x passo 9);
12. Bloquear as células com 10uL de soro de rato (10%) e incubar durante 10min no gelo;
13. Adicionar 25uL dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 (ou, aquando a pesquisa de marcadores de activação, anti-CD44, anti-CD62L e anti-CD19) a e incubar durante 20min no gelo, protegido da luz;
14. Lavar as células 2x;
15. Ressuspender as células em 200uL de FACS wash¹;
16. Transferir as células para tubos de FACS;
17. Manter as células no gelo protegidas da luz até à leitura das mesmas.

Preparação do inóculo de *M. avium* 2447

Para preparação do inóculo de *M. avium*, põe-se a crescer uma colónia obtida de CFU's de ratinho em meio MiddleBrook 7H9, suplementado com ADC e 0.04% de Tween20 (para evitar a formação de grumos). Lê-se a densidade óptica a 600nm (esta deve estar entre 250 e 500). Centrifuga-se a cultura em tubos de 50mL a 4000rpm durante 30 segundos e rejeita-se o sobrenadante. Ressuspende-se o pellet em 5-10mL de soro fisiológico com 0.04% de Tween20 e homogeneiza-se com uma pipeta de Pasteur e vórtex.

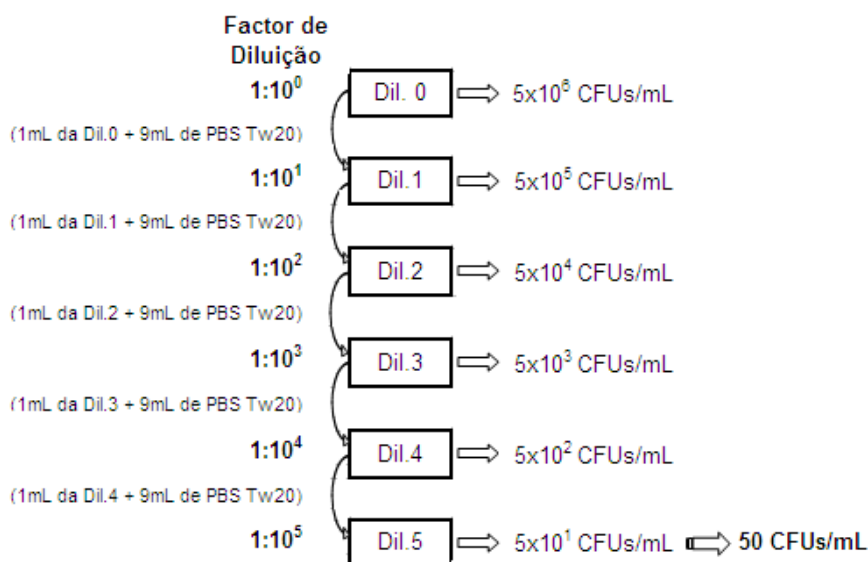
¹ Quando a leitura não é feita após a preparação das amostras, é necessário fixá-las; para isso, adicionar 200uL de PFA a 2% durante 30min, centrifugar 3min @4°C a 1200rpm, rejeitar o sobrenadante e adicionar 200uL de FACS wash; guardar as amostras a 4°C, protegidos da luz, até à leitura das mesmas.

Sonica-se durante 30 segundos a 40-45W e repete-se este passo fazendo no total 3 ciclos de sonicação, efectuando paragens entre cada um para arrefecer a suspensão. Centrifuga-se a 600rpm durante 5 minutos para eliminar os grumos. Ler a densidade óptica a 600nm numa diluição de 1:10². Dilui-se para fazer alíquotas, vortexando sempre muito bem, e congela-se a -70°C. Passados 1-2 dias, descongela-se uma alíquota e faz-se a quantificação do inóculo.

O inóculo stock encontrava-se a uma concentração de 3,3x10⁹ CFU/mL. Para facilitar as pipetagens, diluiu-se esta amostra 10x, de modo a ficar com 3,3x10⁸ CFU/mL. Era necessário infectar 12 animais com 200uL de inóculo a 5x10⁶ CFUs/mL (de forma a que, no final, cada animal recebesse 1x10⁶ CFUs – correspondentes a 200uL injectados). No entanto, preparou-se inóculo em excesso, para um volume final de 10mL. Assim, são necessários 152uL de inóculo num volume total de 10mL (inóculo + Soro Fisiológico com Tw20) para se ter a concentração final de 5x10⁶ CFUs/mL.

$$\begin{aligned}
 & C_i \times V_i = C_f \times V_f \\
 \Rightarrow & 3,3 \times 10^6 \times V_i = 5 \times 10^6 \times 10 \text{ mL} \\
 \Leftrightarrow & V_i = 0,152 \text{ mL} = 152 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Aquando a infecção dos animais, preparam-se também várias diluições do inóculo (5x10⁶ CFUs/mL), de acordo com o esquema seguinte, que foram colocadas em meio e condições de crescimento apropriados, de forma a confirmar se a concentração do mesmo estava correcta.



Assim, na diluição 5, esperavam-se encontrar 50 unidades formadoras de colónias. No entanto, nos dois plaqueamentos encontraram-se 25 e 28 CFUs. Fazendo a média destes valores e multiplicando pelo factor de diluição, chegou-se à conclusão que na realidade o inóculo não tinha 5x10⁶ CFUs/mL mas sim 2,7x10⁵ CFUs/mL. Fazendo as contas para a quantidade de inóculo injectado:

$$\begin{array}{r}
 1\text{mL} \text{ ----- } 2,7 \times 10^6 \text{ CFUs} \\
 200 \times 10^{-3} \text{ mL} \text{ ----- } x \\
 X = 5,4 \times 10^5 \text{ CFUs}
 \end{array}$$

Assim, em vez de 1×10^6 CFUs, injectaram-se $5,4 \times 10^5$ CFUs, menos $4,6 \times 10^5$ CFUs do que o pretendido.

Imunofluorescência: Marcação de macrófagos e micobactérias

- 1) Fixar os cortes com acetona durante 5min @RT;
- 2) Lavar 3x durante 5min com PBS 0,05%Tw20 para rehidratar os tecidos;
- 3) Incubar com PBS 0,05%Tw20 com 10% de Soro de Cabra durante 1h@RT em câmara húmida;
- 4) Incubar com os anticorpos primários O/N @ 4°C em câmara húmida (*Nota*: diluir os anticorpos em PBS 0,05%Tw20 com 5% de Soro de cabra);
- 5) Lavar 3x durante 5min com PBS 0,05%Tw20;
- 6) Incubar com os anticorpos secundários durante 1h @ RT em câmara húmida, protegido da luz;
- 7) Lavar 3x durante 10min PBS 0,05%Tw20;
- 8) Montar com VectaShield e colar a lamela à lâmina com verniz;
- 9) Conservar a 4°C durante o tempo necessário.

Anticorpo	Diluição utilizada	Marcação
Anticorpo primário "Rat anti-mouse F4/80"	1:150	Macrófagos
Anticorpo Secundário "Alexa Fluor 594 Goat anti-Rat IgG"	1:2000	
Anticorpo primário "Rabbit anti-mycobacterium spp"	1:200	Micobactérias
Anticorpo Secundário "Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG"	1:2000	

Imunohistoquímica: marcação de micobactérias e macrófagos

1) Desparafinação e rehidratação dos tecidos

- | | |
|------------------------|--------|
| 1.1) Xilol | 2x3min |
| 1.2) EtOH Absoluto | 2x3min |
| 1.3) EtOH 96% | 2min |
| 1.4) EtOH 70% | 2min |
| 1.5) EtOH 50% | 2min |
| 1.6) dH ₂ O | 2min |

2) Antigen Retrieval com solução comercial

- 2.1) Aquecer 300mL da solução comercial de Tampão citrato (Thermo Scientific) (diluída de 1:10) numa caixa plástica coberta na temperatura máxima do microondas durante 5min;
- 2.2) Colocar as lâminas (numa rack) dentro da solução e aquecer a temperatura baixa no microondas durante 20min;
- 2.3) Deixar arrefecer @ RT durante 15min e colocar as lâminas em dH₂O.

3) Bloqueamento da actividade da peroxidase endógena

- 3.1) Incubar com H₂O₂ 3% durante 10min protegido da luz;
- 3.2) Lavar 3x3min com dH₂O;
- 3.3) Lavar 3x3min com PBS 0,05% Tw20

4) Bloqueamento de ligações inespecíficas

- 5.1) Incubar com PBS 0,05%Tw20 com 10% Soro de cabra e anti-Fc receptor (1/1000) 1h @ RT em câmara húmida (este bloqueio é para a marcação de micobactérias; para a marcação de F4/80, a solução de bloqueio foi com PBS 0,05%Tw20 com 10% de BSA e anti-Fc receptor na diluição de 1:1000);

5) Incubar com o anticorpo primário O/N @ 4°C em câmara húmida (*Nota*: diluir os anticorpos em PBS 0,05%Tw20 com 5% de Soro de cabra);

6) Lavar 2x5min com PBS 0,05% Tw20;

7) Incubar com o anticorpo secundário durante 1h@RT em câmara húmida;

8) Lavar 2x5min com PBS 0,05% Tw20;

9) Incubar 1h @ RT com streptavidina (LabVision) em câmara húmida;

10) Lavar 2x5min com PBS 0,05% Tw20;

11) Lavar 1x5min com Tris-HCl 0,1M pH 7,2;

12) Incubar com DAB, no máximo, 10min;

13) Lavar com água corrente durante 5min;

14) Corar com hematoxilina durante 3seg;

15) Lavar com água corrente durante 1min;

- 16) “Azular” com água amoniacal 0,5% durante 6seg;
- 17) Lavar com água corrente durante 6min;
- 18) Lavar com água corrente durante 4min;
- 19) Desidratar as amostras:
 - 19.1) EtOH 50% 2min;
 - 19.2) EtOH 70% 2min;
 - 19.3) EtOH 96% 2min;
 - 19.4) EtOH absoluto 2min;
 - 19.5) Xilol 2min;
- 20) Montar com entelan.

Anticorpo	Diluição utilizada	Marcação
Anticorpo primário “Rat anti-mouse F4/80”	1:50	Macrófagos
“Biotinilated Rabbit anti-rat”	1:50	
“Rat IgG2b Negative control”	1:5	
Anticorpo primário “Rabbit anti- <i>mycobacterium spp</i> ”	1:50	Micobactérias
“Biotinilated Goat anti-Rabbit IgG”	1:375	