

PERGUNTA:

Como se processa o reconhecimento das células **T efetoras** por parte das **T reguladoras**?
Necessitam da mediação das células apresentadoras de antígeno, **APC**, ou a sua acção é independente?

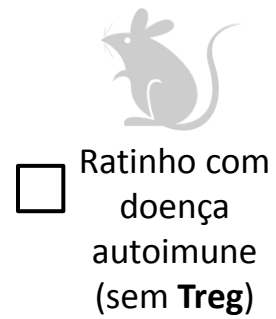
OBJECTIVO:

Avaliar se a acção inibitória das células T Reguladoras (**Treg**) nas T efetoras (**Tef**) depende da presença das células apresentadoras de antígeno (**APC**).

EXPERIÊNCIA(S):

1. Obter por separação celular as populações **Treg**, **Tef** e **APC**.
2. Testar a acção inibitória das **Treg** nas **Tef** *in vitro* na PRESENÇA e AUSÊNCIA de **APC**, medindo a frequência das células T efetoras e a sua proliferação por citometria de fluxo.

Animais:



Anticorpos:

- Anti-CD4-Vermelho
- Anti-CD25-Laranja
- Anti-Foxp3-Amarelo
- Anti-B220-Verde
- Anti-CD4-Verde
- Anti-B220-Azul
- Anti-CD25-Vermelho

Caracterização Populações Celulares

Tef naive:	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ (B220 ⁻)
Tef activado:	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (B220 ⁻)
Treg:	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (B220 ⁻)
APC:	B220 ⁺ (CD4 ⁻ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻)

- Proliferação -Vermelho
- Proliferação -Amarelo
- Proliferação -Azul

Foxp3 – GFP (Verde)

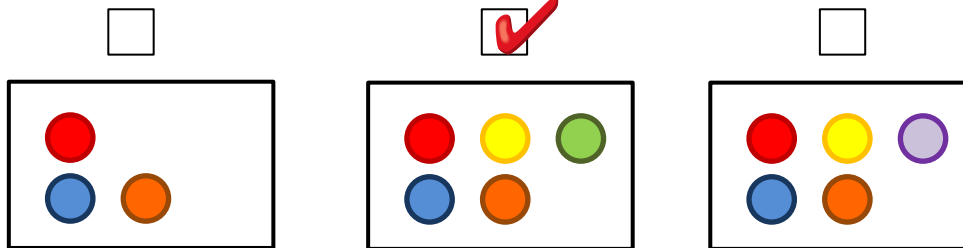
Anticorpos:

- Anti-CD4-Vermelho
- Anti-CD25-Laranja
- Anti-B220-Azul
- Proliferação -Amarelo
- Foxp3 – GFP (Verde)

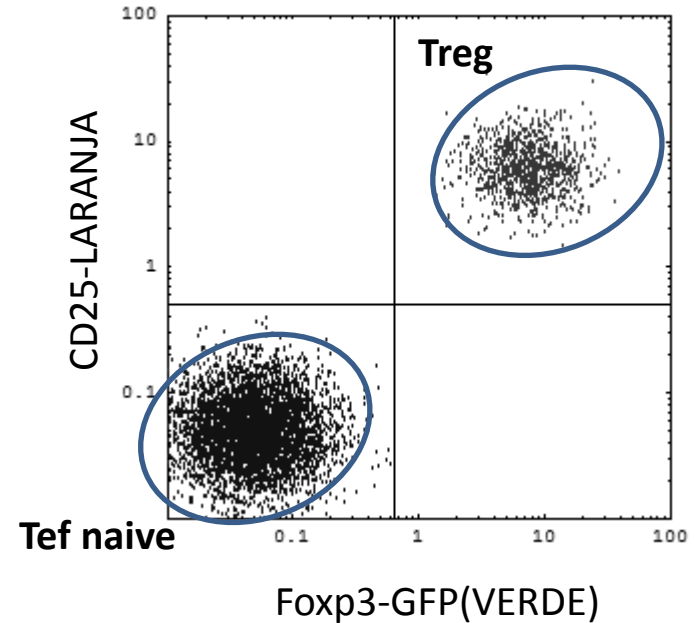
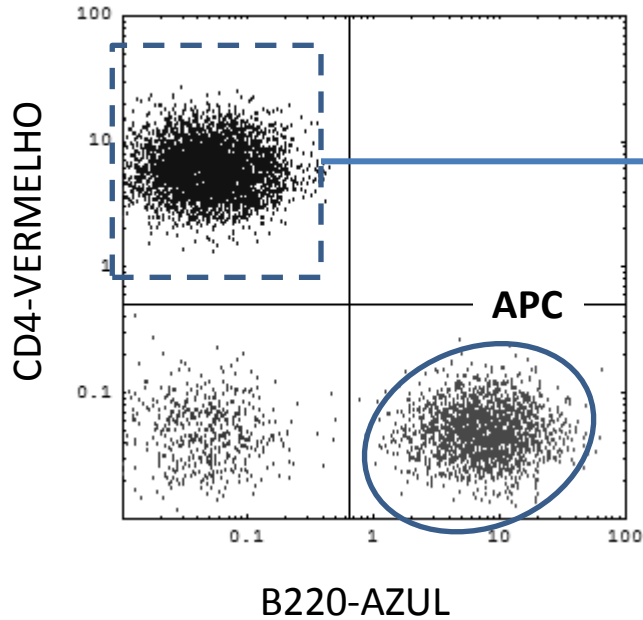
Caracterização Populações Celulares

Tef naive:	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ (B220 ⁻)
Tef activado:	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (B220 ⁻)
Treg:	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (B220 ⁻)
APC:	B220 ⁺ (CD4 ⁻ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻)

Citómetro:



Separação Celular das Populações Tef, Treg e APC

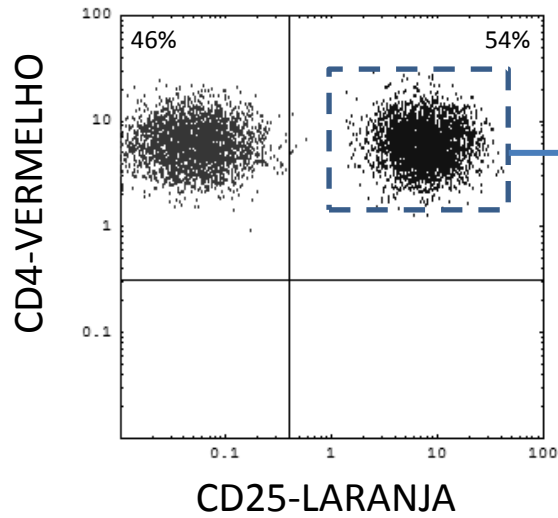
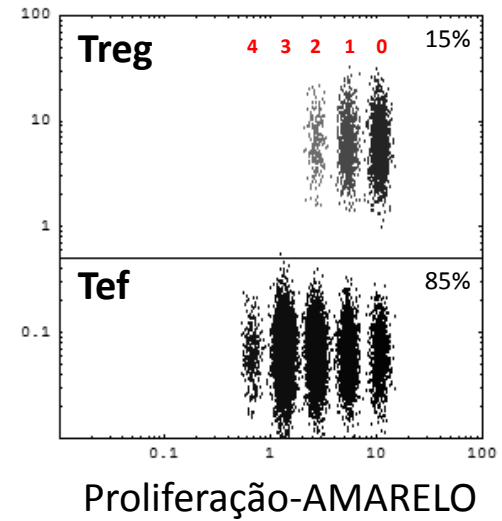
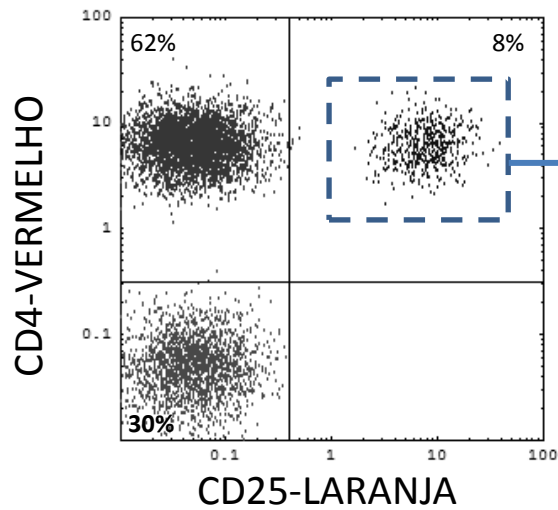
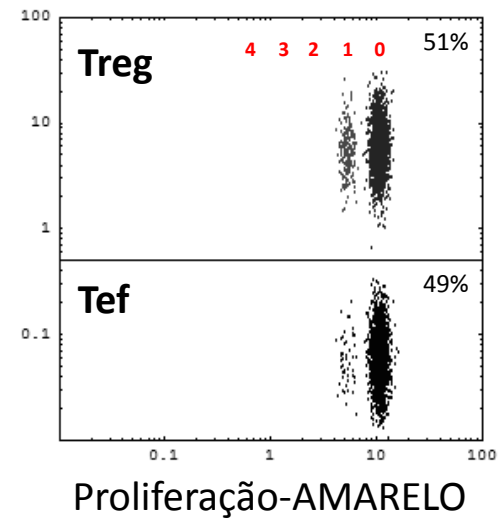


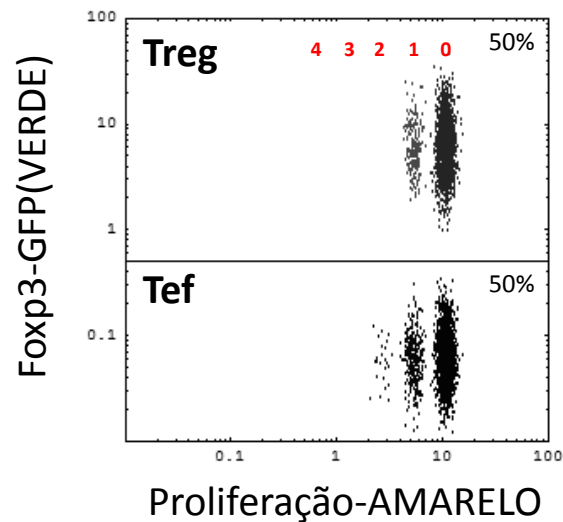
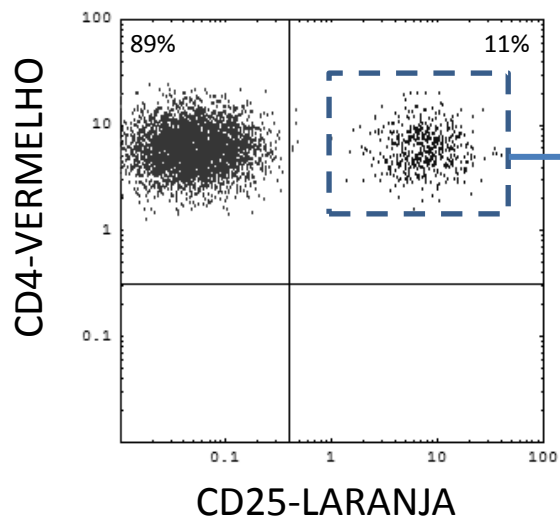
Caracterização Populações Celulares

Tef naive: CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ (B220⁻)

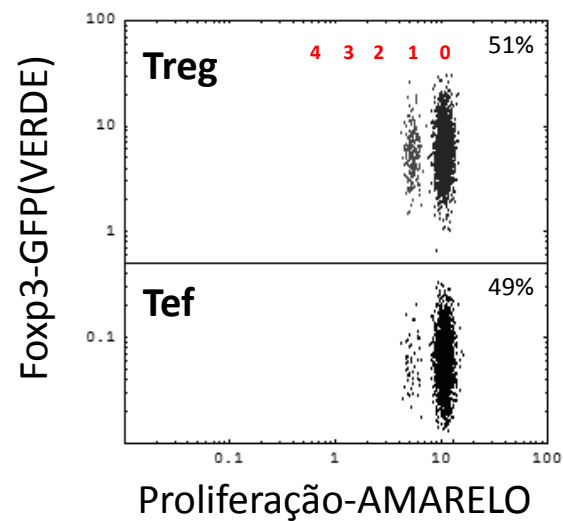
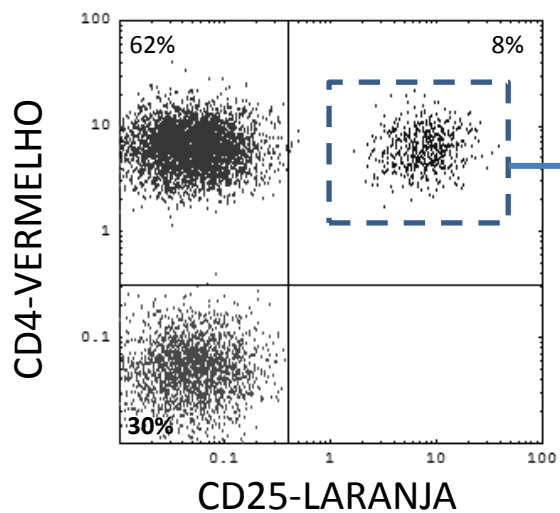
Treg: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (B220⁻)

APC: B220⁺ (CD4⁻CD25⁻Foxp3⁻)

A**Sem APC****Foxp3-GFP (VERDE)****Observações:** Sem APC, Tef proliferam. Treg não inibem Tef.**Com APC****Foxp3-GFP(VERDE)****Observações:** Com APC, Tef não proliferam. Treg inibem Tef.

B**Sem APC**

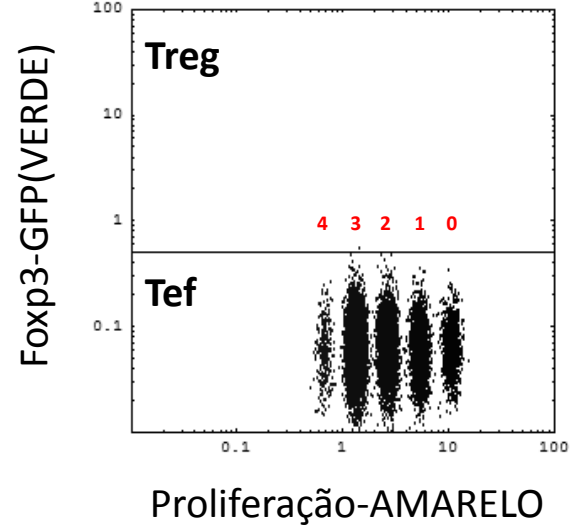
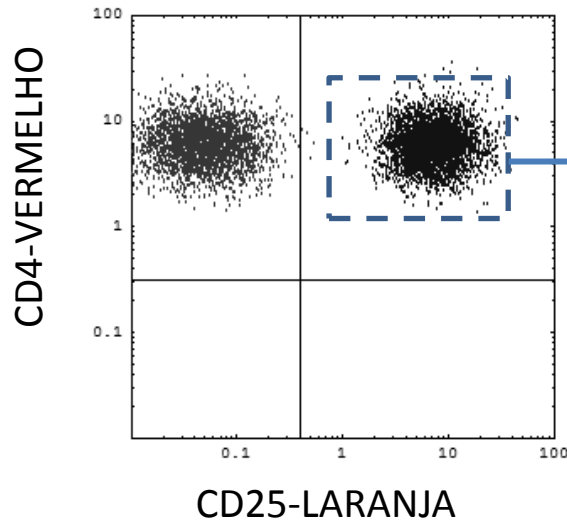
Observações: Sem APC, Tef não proliferam. Treg inibem Tef.

Com APC

Observações: Com APC, Tef não proliferam. Treg inibem Tef.

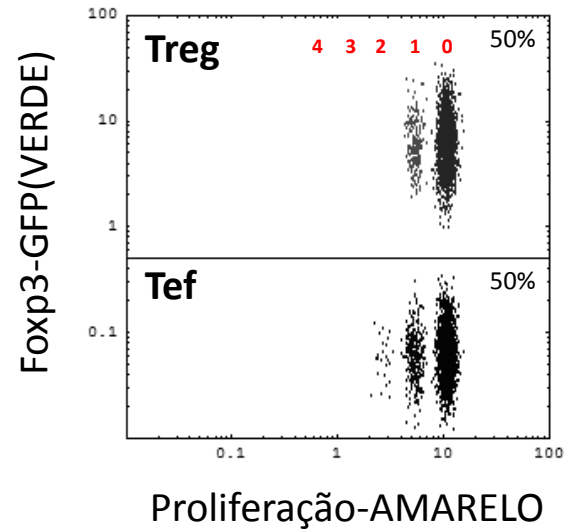
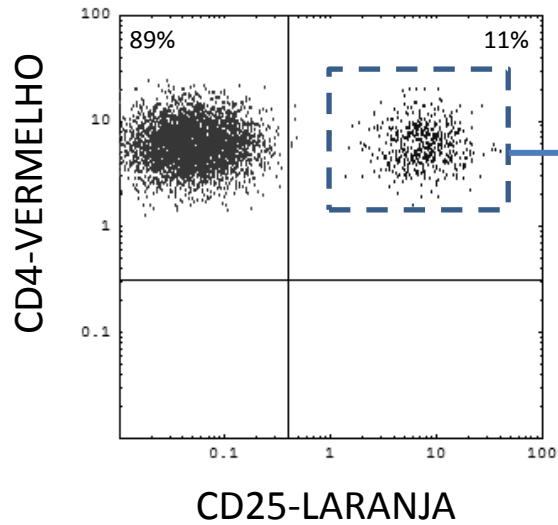
Controlo

Sem APC e sem Tregs

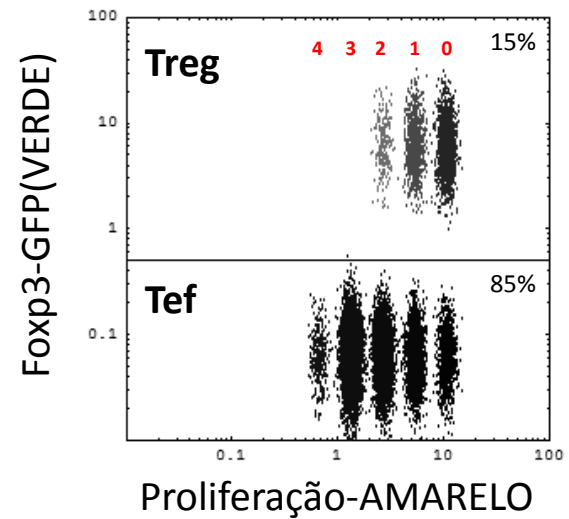
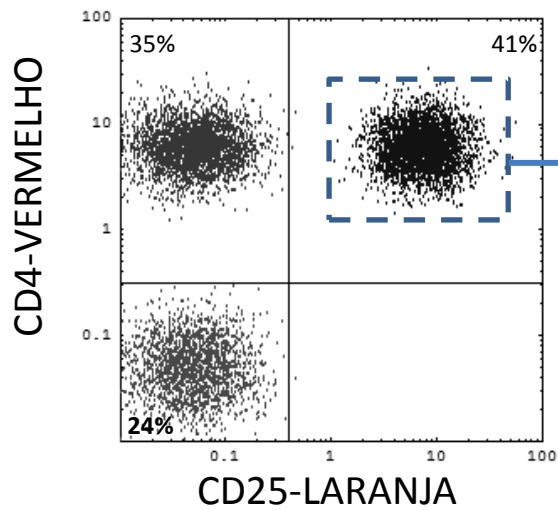


Observações: Sem APC e Treg, Tef proliferam (foram previamente ativadas).

Com este controlo mostra-se que a inibição da proliferação é resultado das Treg. Se o controlo mostrasse que as Tef não proliferavam, o resultado B poderia ser um artefacto, ou seja, a inibição da proliferação não poderia ser atribuída à acção das Treg, independentemente de estarem ou não na presença das APC.

C**Sem APC**

Observações: Sem APC, Tef não proliferam. Treg inibem Tef.

Com APC

Observações: Com APC, Tef proliferam. Treg não inibem Tef.