

## VII - CONCLUSÕES PERSPECTIVAS FUTURAS

### 1. Avaliação de um novo modelo animal para o estudo de infecções por micobactérias

Um dos objectivos deste trabalho de estágio foi avaliar a utilidade de um novo modelo animal para o estudo da resposta imunitária a infecções por micobactérias. Esta linha de murganhos consiste em animais transgénicos para um receptor de células T (TCR) capaz de reconhecer células infectadas com *M. avium*. Este TCR foi seleccionado pela sua capacidade de reconhecer antígenos de *M. avium* apresentados por moléculas de MHC de classe II (MHC II) em células infectadas. Durante o estágio foi estabelecido um protocolo baseado na técnica de PCR para identificar animais transgénicos para a cadeia  $\alpha$  e para a cadeia  $\beta$  do TCR; foi ainda utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar se os animais transgénicos expressavam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR; e foi iniciada uma experiência piloto de infecção para avaliar a capacidade das células que expressavam o TCR transgénico de responder à infecção por *M. avium*.

A primeira tarefa realizada neste estágio foi a optimização de um protocolo de PCR para a genotipagem dos murganhos desta linha – myc TCR. Para obter o melhor protocolo possível foram avaliadas as seguintes variáveis: concentração de  $MgCl_2$ , parâmetros dos ciclos de PCR (como a temperatura de *annealing* dos *primers*, o número de ciclos de amplificação), introdução de DMSO e a quantidade de DNA genómico na reacção. Para que esta optimização fosse bem sucedida, utilizaram-se controlos positivos e negativos, que, tal como demonstrado, são elementos essenciais na avaliação do resultado de uma amplificação por PCR.

Após a genotipagem dos animais por PCR, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo para avaliar se os animais transgénicos, além de conterem os genes do TCR no seu genoma, estavam a expressá-los correctamente em linfócitos T. Através da análise dos gráficos de expressão de  $V\alpha 2$  e  $V\alpha 11$  verificou-se que, apesar de conterem o transgene no seu genoma, os animais não estavam a expressar o transgene da cadeia  $\alpha$  ( $V\alpha 11$ ). No entanto, verificou-se que o gene que codifica a cadeia beta ( $V\beta 10$ ) do TCR estava a ser expresso. Os resultados obtidos mostram uma grande variação na percentagem de linfócitos T que expressa este gene, o que levou à definição de 3 perfis distintos de expressão: expressão de um animal não transgénico (ou seja, expressão normal do gene  $V\beta 10$  nos murganhos WT), expressão

homogénea do transgene V $\beta$ 10, ou seja, em cerca de 100% dos linfócitos T (expressão esperada num animal transgénico) e expressão heterogénea de V $\beta$ 10, ou seja, expressão numa percentagem variável de linfócitos T. Esta expressão heterogénea do gene que codifica a cadeia  $\beta$  do TCR deve-se provavelmente ao facto dos animais ainda não se encontrarem em fundo genético correcto (C57BL/6), tendo apenas um animal apresentado expressão homogénea de V $\beta$ 10, ou seja, o padrão de expressão esperado.

Quando se efectuou o estudo de marcadores de activação (CD44, CD62L) nos animais transgénicos infectados com *M. avium* verificou-se apenas um ligeiro aumento da expressão de CD44 nos linfócitos T dos animais transgénicos, não se tendo observado qualquer diferença na expressão de CD62L aos 25 dias após infecção (correspondente ao pico da infecção) entre animais transgénicos e não transgénicos. Assim, de futuro, para conseguir clarificar a utilidade deste modelo no estudo de infecções por micobactérias, será necessário em primeiro lugar cruzar estes animais com animais da estirpe C57BL/6 por forma a terem um fundo genético homogéneo e correspondente ao fundo dos animais dos quais foi seleccionado o TCR transgénico. Este trabalho foi iniciado durante o estágio mas vai prolongar-se por várias gerações de murganhos. Só quando os animais estiverem no fundo genético correcto se poderá ter a certeza da não expressão da cadeia  $\alpha$  do TCR transgénico.

Também de futuro serão realizadas mais experiências de infecção, preferencialmente com animais já no fundo genético correcto para confirmar a capacidade deste TCR reconhecer *in vivo* células infectadas por *M. avium*. É ainda importante salientar que a falta de expressão da cadeia  $\alpha$  se pode também dever a outros factores, tais como: o transgene ter sido mal executado (facto este pouco provável já que a sequência foi verificada, tendo-se observado uma correspondência exacta à das células T iniciais); não ter havido integração total do transgene no genoma, estando em falta uma parte essencial à expressão do gene (sendo o transgene extremamente longo, cerca de 20.000 bp, será extremamente difícil avaliar esta possibilidade); é ainda possível que o transgene seja expresso ao nível do timo mas não nas células T periféricas por não serem seleccionadas; para verificar esta hipótese, será de futuro estudada a expressão do transgene em linfócitos T em desenvolvimento no timo.

## 2. Identificação das células infectadas por *M. avium* utilizando técnicas de imunofluorescência e de imunohistoquímica

Outro dos objectivos deste trabalho foi utilizar técnicas de imunohistoquímica e de imunofluorescência, recorrendo a anticorpos para determinados marcadores celulares, para identificar as células infectadas com *M. avium* nos diferentes tecidos de murganhos.

Tal como foi dito anteriormente, o timo é um dos órgãos alvos da infecção por micobactérias (Nóbrega *et al.*, 2007). Para descobrir quais as células infectadas no timo, recorreu-se à marcação por imunofluorescência de tecidos infectados congelados. Com esta técnica, pretendia-se marcar macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e micobactérias para saber especificamente em que células se encontravam as micobactérias. No entanto, observámos que a já conhecida ligeira autofluorescência dos macrófagos, é muitíssimo aumentada quando estas células se encontram infectados por micobactérias. Esta nossa observação foi também relatada por outros autores (Davenport *et al.*, 2000; Padilla *et al.*, 2000), e também que quando é usado o fluorocromo FITC (verde) para observação de micobactérias, a autofluorescência das bactérias é tal que se torna praticamente impossível distinguir resultados positivos dos negativos. Uma das soluções possíveis para este problema seria usar um filtro duplo FITC/Texas Red (verde/vermelho) num microscópio de fluorescência. Lehtola *et al* (2006), afirmam que o branqueamento das micobactérias com permanganato de potássio (método este usado na coloração de auramina-rodamina de micobactérias) seria outro modo de solucionar o problema. Por outro lado, a autofluorescência das micobactérias pode ser reduzida ou eliminada através da irradiação com uma luz forte dos tecidos antes da marcação com fluorescência ser efectuada (Neumann e Gabel, 2002). Na continuação deste trabalho serão seguramente ensaiadas estas técnicas. Neste trabalho de estágio optámos por proceder à marcação destas células por imunohistoquímica, numa tentativa de contornar o problema de autofluorescência.

Este processo não foi simples pois uma das técnicas ensaiadas provocou o aparecimento de vesículas de tom amarelo-acastanhado (devido a uma reacção inespecífica com o DAB do material que se encontrava incorporado nestas vesículas) que muitas vezes induziam em erro na classificação de marcação específica e não específica do tecido. Finalmente, as condições para marcação das micobactérias foram conseguidas quando se aumentou a concentração do anticorpo primário anti-*mycobacterium spp* originando marcações muito boas em tecidos muito infectados. No entanto, em tecidos pouco infectados era ainda difícil observar as micobactérias.

Como foram ensaiadas várias condições de marcação e não se conseguiu melhorar o nível de detecção para tecidos pouco infectados decidiu-se que se iria utilizar este protocolo para tecidos com grande carga bacteriana e que se iriam testar outros anticorpos disponíveis no mercado para procurar aumentar a sensibilidade da marcação sem perder a especificidade conseguida.

Tal como a marcação de micobactérias por imunohistoquímica, a marcação de macrófagos com o anticorpo anti-F4/80 também teve de ser optimizada. Mais uma vez, a recuperação de epítomos não melhorou a marcação, e foi o aumento da concentração tanto do anticorpo primário como do secundário que levou à correcta marcação de macrófagos.

Conjugando a técnica de imunohistoquímica com a coloração de Zhiel-Neelson, tal como foi descrito anteriormente por outros autores (Jung *et al.*, 2002), conseguiu-se mostrar claramente que os macrófagos são as células mais frequentemente infectadas por *M. avium*. Foi ainda interessante observar que a qualidade da marcação com o anticorpo específico para macrófagos variava com os tecidos estudados, facto ainda pouco estudado. Assim, de futuro será interessante avaliar o metabolismo das micobactérias nos diferentes órgãos, comparando quais as células infectadas e a resposta imunitária local. Há muito que se sabe que a carga bacteriana é controlada de forma diferente em diferentes órgãos. Estes resultados apontam também para uma diferença tanto nas células infectadas como potencialmente nas bactérias, o que será alvo de investigação futura.