

I – RESUMO

Um dos objectivos do presente trabalho foi avaliar a utilidade de um novo modelo animal transgénico para um receptor de células T (TCR) capaz de reconhecer células infectadas com *M. avium*. Após optimizado o PCR para genotipagem desta linha de transgénicos, verificou-se que quando os animais eram transgénicos obtinha-se uma forte amplificação correspondente à presença do transgene. Por outro lado, quando os animais não eram transgénicos, obtinha-se uma banda de amplificação ténue, que correspondia ao gene endógeno.

Através da técnica de citometria de fluxo, avaliou-se se os animais transgénicos, além de conterem os transgenes do TCR no seu genoma, estavam a expressá-los correctamente nos linfócitos T. Verificou-se que a cadeia α do TCR (gene $V\alpha 11$) não estava a ser expressa, enquanto que, o gene que codifica a cadeia β ($V\beta 10$) apresentava 3 tipos de expressão: expressão normal de um animal WT e expressão homogénea e heterogénea do transgene. Esta diferença de expressão do gene $V\beta 10$ deve-se ao facto dos animais ainda não se encontrarem no fundo genético correcto.

Na avaliação de marcadores de activação nos animais transgénicos infectados com *M. avium* verificou-se apenas um pequeno aumento da expressão de CD44 nos linfócitos T, não se tendo verificado grandes diferenças de expressão do marcador CD62L nos dois tempos de infecção estudados. Assim, serão necessários estudos futuros para uma avaliação mais aprofundada da utilidade deste modelo.

Outro dos objectivos deste trabalho foi saber quais as células infectadas por *M. avium*, recorrendo-se às técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica. Na técnica de imunofluorescência deparámo-nos com um problema de autofluorescência de macrófagos. Assim, procedeu-se à marcação destas células por imunohistoquímica. Verificou-se que o anticorpo usado para marcação de micobactérias era útil quando a concentração bacteriana no tecido era elevada mas, no entanto, era duvidosa quando a concentração era menor. Na marcação de macrófagos por imunohistoquímica em conjunto com a coloração de Zhiel-Neelson verificou-se que os macrófagos são realmente as células mais frequentemente infectadas por *M. avium* mas que esta marcação, tal como a marcação com o anticorpo específico para micobactérias, era mais facilmente detectada nuns órgãos do que noutros.

Palavras-chave: murganhos MycTCR, *Mycobacterium avium*, imunofluorescência, imunohistoquímica, infecção

I – ABSTRACT

One of the objectives of the present work was to evaluate the utility of a new transgenic animal model for a T-cell receptor (TCR) capable of recognizing cells infected with *M. avium*. After the optimization, the PCR for genotyping this transgenic line, verified itself that when the animals were transgenic we had a strong corresponding amplification to the presence of the transgene. On the other hand, when the animals were not transgenic, we had a tenuous band of amplification that corresponded to the endogenous gene.

With flow cytometry, we evaluated if the transgenic animals, beyond containing the transgenes of the TCR in its genome, express them correctly in the T lymphocytes. We concluded that the α chain of the TCR ($V\alpha 11$ gene) was not being expressed, whereas, the gene that encodes the β chain ($V\beta 10$) presented 3 kinds of expression: normal expression of a wild type animal and homogeneous and heterogeneous expression of the transgene. This difference of expression of the $V\beta 10$ gene was due to the fact that the animals weren't yet in the correct genetic background.

In the evaluation of activation markers in the transgenic animals infected with *M. avium* it was verified only a slightly increase of CD44 expression on T lymphocytes, but not big differences of expression of CD62L marker in the two times of infection studied. Because of these results, it will be necessary future studies for a deepen evaluation of the utility of this model.

Other objective of this work was to know which cells were more infected by *M. avium*, using immunofluorescence and immunohistochemistry techniques. During immunofluorescence marking, we found a problem: macrophage autofluorescence. Because of this, we proceeded to the marking of these cells by immunohistochemistry. With this technique was verified that the antibody used for marking of mycobacteria was helpful when the bacteria concentration was high but, however, was doubtful when the concentration was minor. In the marking of macrophages by immunohistochemistry in assembly with the Zhiel-Neelson technique we verified that the macrophages were the cells more frequently infected by *M. avium*. However, this could be observed more easily in some organs than in others, just like when we used the specific mycobacteria antibody.

Keywords: MycTCR mouse, Mycobacterium avium, immunofluorescence, immunohistochemistry, infection

II – AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento à Professora Lídia, por toda a disponibilidade e apoio que me prestou ao longo de todo o curso e durante esta fase final que foi o estágio.

Um agradecimento também muito especial à Margarida, que mesmo eu lhe tendo caído em Braga de “pára-quedas aos trambolhões”, sempre acreditou em mim, mesmo quando eu própria duvidava. Obrigado por ter aceite a “Fininha” (II) como sua estagiária, mesmo tendo sido nas condições em que foi. Obrigado por todo o apoio e força que me deu até agora. Obrigado por tudo.

Um obrigado a todo o pessoal do ICVS, que me recebeu de braços abertos e que, directa ou indirectamente me ajudaram a realizar e concluir o meu estágio. Um obrigado em especial ao I&D2 e à Goretti (que só passado muito tempo descobri que afinal a senhora que eu andava sempre a pedir para a chatear com as minhas imunos, se chamava Lucília!).

À Susana Roque, pela amizade, apoio e paciência para as minhas questões infundáveis. À Cláudia Nóbrega, que apesar de pouco tempo juntas, me ajudou sempre que podia, nem que fosse a uns milhares de quilómetros de Braga.

Um eterno obrigado às minhas duas muletas, a Andreia e a Sara. Obrigado por me mostrarem que ainda existe amizade pura, sem interesses e cobranças. Por todos os momentos que passámos juntas nestes 7 meses, uns melhores que outros, mas que passámos sempre unidas.

Ao Alberto, que mal me conhecendo já tinha de me aturar a falar de PCR's. À Susaninha, minha companheira de casa, que com aquele sorriso iluminava tudo e todos. Era impossível estar contigo sem ficar com um sorriso nos lábios. A toda a família Tschopp da Mota, pela amizade e carinho com que sempre me trataram.

Um grande obrigado ao “Trenquinho”, que lutou contra tudo e todos só para me fazer voltar a subir estas escadas sem fim, degrau a degrau, até eu conseguir subi-las de novo sozinha. Je t'adore...

Por fim, mas SEMPRE em primeiro, um eterno obrigado aos meus pais e ao meu mano (que apesar de 3x5, já sabe como se faz um PCR!!). Sem vocês nada disto teria sido possível! Pelo apoio incondicional, por todo o amor e carinho, e por sempre terem acreditado em mim! Um MUITO obrigado!

Um obrigado também a uma frase que hei-de levar sempre comigo para onde quer que vá:

“- O que é isto?

- Não sei, diz-me tu...”. ☺

III – ÍNDICE

I – Resumo.....	1
I – Abstract.....	2
II – Agradecimentos.....	3
III – Índice.....	4
IV – Introdução.....	6
1. Micobactérias e infecções por estes agentes.....	6
2. Resposta imunitária à infecção por micobactérias.....	10
3. Importância dos modelos animais no estudo da resposta à infecção por micobactérias.....	12
V – Objectivos.....	15
VI – Materiais e métodos.....	16
1. Murganhos.....	16
2. PCR para genotipagem de murganhos da estirpe mycTCR	16
a) Extracção de DNA de cauda de murganho	16
b) Quantificação do DNA extraído	17
c) Preparação da MasterMix para PCR	17
d) Controlos positivos α e β (DNA plasmídico) e controlo negativo	18
e) Programa de PCR	19
f) Electroforese	19
3. Citometria de fluxo.....	20
4. Infecção de murganhos com <i>M. avium</i> 2447.....	21
5. Marcação de células infectadas com <i>M. avium</i> por imunohistoquímica e imunofluorescência.....	21
5.1. Técnicas de imunohistologia.....	21
a) Preparação dos tecidos antes da marcação	21
b) Imunohistoquímica	22
c) Imunofluorescência	23
5.2. Escolha dos anticorpos para marcação de macrófagos e micobactérias	23
5.3. Controlos positivos e negativos	24
5.4. Protocolos	25
VII – Resultados.....	26
1. Avaliação de um potencial novo modelo animal para o estudo da resposta T em infecções por micobactérias.....	26
1.1.Murganhos transgénicos myc TCR.....	26

1.2. Otimização do PCR para genotipagem de murganhos mycTCR.....	27
1.3. Estudo da expressão das cadeias α e β dos TCR's por citometria de fluxo.....	35
1.4. Estudo da resposta à infecção por <i>M. avium</i> de murganhos transgênicos (myc TCR)	39
2. Marcação de células infectadas com <i>M. avium</i> por imunohistoquímica e imunofluorescência.....	42
2.1. Imunofluorescência: marcação de macrófagos e micobactérias	42
a) Autofluorescência dos macrófagos.....	45
2.2. Imunohistoquímica: marcação de macrófagos e micobactérias	46
a) Otimização da marcação de micobactérias.....	46
b) Otimização da marcação de macrófagos.....	49
c) Imunohistoquímica e Zhiel-Neelson: marcação de macrófagos (IHC) e micobactérias (ZN).....	50
VIII – Conclusões e perspectivas futuras.....	52
1. Avaliação de um novo modelo animal para o estudo de infecções por micobactérias	52
2. Identificação das células infectadas por <i>M. avium</i> utilizando técnicas de imunofluorescência e de imunohistoquímica.....	54
IX – Bibliografia.....	56
Anexos	
Anexo I – Protocolos.....	i
Anexo II – Cálculo da Tm e da Ta dos <i>Primers</i>	vii
Anexo III – Dados das citometrias de fluxo.....	ix
Anexo IV – Lista de reagentes.....	xv
Anexo V – Lista de Abreviaturas.....	xviii

IV – INTRODUÇÃO

1. Micobactérias e infecções por estes agentes

A grande maioria das espécies do género *Mycobacterium* são bactérias saprófitas de vida livre (Falkinham, 1996). As micobactérias adaptaram-se a várias condições ambientais e crescem em solos e águas. Estas podem sobreviver tanto em águas doces ou salgadas e também em águas tratadas, incluindo piscinas e águas para consumo, sendo os aerossóis libertados por estas águas considerados a via mais comum de propagação das micobactérias. Os requisitos metabólicos destas bactérias nos seus nichos naturais são pouco conhecidos. Por exemplo, no que diz respeito a sistemas de distribuição de água potável, *Mycobacterium avium* é preferencialmente isolado de amostras de águas enquanto que, *Mycobacterium intracellulare* é isolado de biofilmes (Falkinham, J.O. 3rd *et al.*, 2001). Apenas algumas micobactérias, como é o caso de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* (identificados pela primeira vez em humanos e gado, respectivamente, mas capazes de infectar outras espécies animais), não foram ainda identificadas em fontes ambientais. Este facto sugere que estas bactérias são parasitas obrigatórios de humanos e/ou animais.

Todos os humanos encontram-se expostos a micobactérias ambientais, geralmente através da pele e das membranas mucosas (principalmente o epitélio digestivo e respiratório). Por outro lado, a maioria das crianças a nível mundial encontram-se vacinadas com a vacina BCG (bacilo de Calmette e Guérin). Nos países menos desenvolvidos, existe uma grande proporção de humanos também expostos a *M. tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*.

As micobactérias não aparentam fazer parte da microbiota comensal do Homem, já que não se conseguiu isolá-las em amostras de pele ou membranas mucosas de pacientes saudáveis, ao contrário de amostras provenientes de pacientes infectados (Casanova e Abel, 2002).

As micobactérias causam um amplo espectro de doenças em humanos. *M. leprae* é o agente responsável pela lepra, tendo sido reportados cerca de 259.000 novos casos desta doença em 2005 (WHO, 2006). Esta micobactéria reside em células de Schwann e macrófagos. A lepra é uma doença crónica granulomatosa da pele e dos nervos periféricos e quando tratada atempadamente com antibióticos adequados, é a infecção por micobactérias mais facilmente curável.

M. tuberculosis e espécies relacionadas (por exemplo, *M. bovis*) causam a doença denominada tuberculose. A maioria dos casos de tuberculose humana deve-se

à infecção por *M. tuberculosis*, sendo anualmente reportados cerca de 8,8 milhões de novos casos por todo o mundo, resultando em quase 1,6 milhões de mortes – Figura 1 (WHO, 2006).

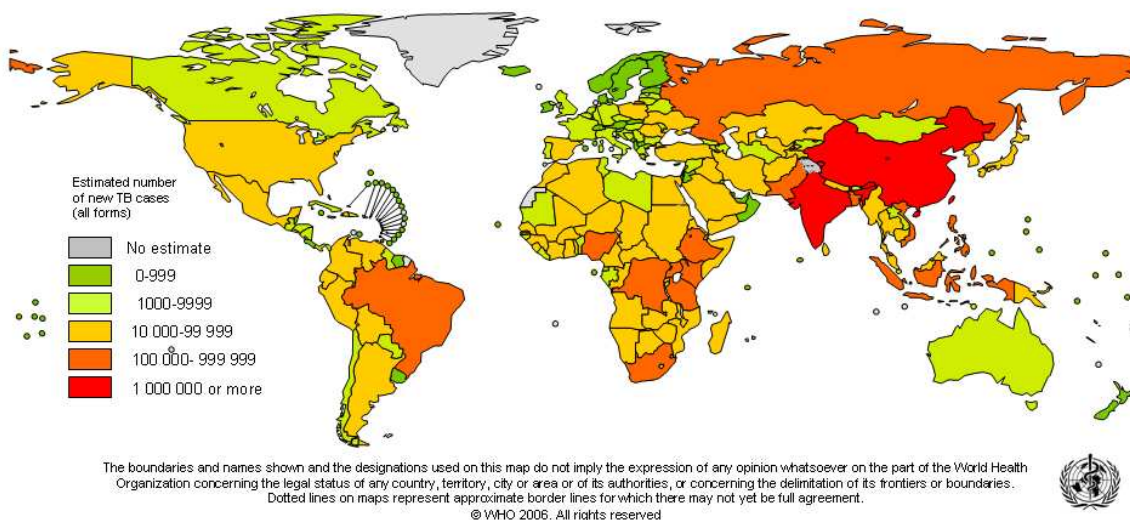


Figura 1 - Número estimado de novos casos de Tuberculose, 2005 (Retirado de WHO, 2006)

M. tuberculosis sobrevive no interior de macrófagos, que despoletam muitas vezes a formação de granulomas circundantes. Apesar de ser geralmente vista como uma doença estritamente pulmonar, a tuberculose pode afectar qualquer órgão (Nóbrega *et al.*, 2007).

A úlcera de Buruli, causada pela micobactéria *M. ulcerans*, é a terceira doença micobacteriana mais comum no mundo. Esta doença foi reportada em 30 países de África, América, Ásia e Pacífico Oeste, principalmente em regiões tropicais ou subtropicais. Apesar da incidência mundial exacta desta doença ser desconhecida, o número de casos reportados têm aumentado nestes últimos anos (WHO, 2007). Ao contrário das outras micobactérias, *M. ulcerans* cresce extracelularmente e a sua patogenia parece resultar principalmente da secreção de uma toxina, a micolactona. Esta doença crónica causa úlceras indolores na pele (Casanova e Abel, 2002).

Muitas outras micobactérias (por exemplo, *Mycobacterium avium*) podem causar ocasionalmente doença disseminada ou localizada. Tal como estas micobactérias, as vacinas também podem causar doença local ou disseminada, mais concretamente em pessoas imunodeprimidas. É difícil distinguir a exposição e infecção com uma micobactéria sem ser a BCG (que é inoculada) já que a exposição individual do hospedeiro não pode ser verificada.

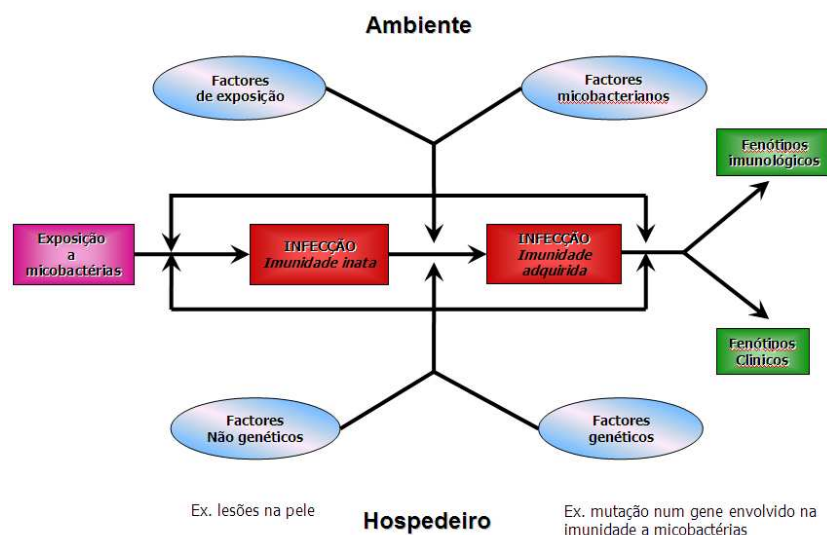


Figura 2 – Interação entre humanos e micobactérias. A exposição nem sempre resulta em infecção. O estabelecimento ou não da infecção depende da imunidade inata, ou da anterior em conjunto com a imunidade adquirida (esquema retirado de Casanova e Abel, 2002).

É provável que a exposição à maioria das micobactérias raramente resulte em infecção. A frequência de infecção é provavelmente subestimada já que muitas vezes é baseada na detecção de fenótipos imunológicos, que reflectem uma resposta imune adquirida de memória (resposta imune adquirida após contacto com o antigénio, neste caso, com as micobactérias). A imunidade inata, a resposta primária do organismo a uma infecção, actua antes da imunidade adquirida de memória se desenvolver, e poderá ser suficiente para controlar a infecção, fazendo com que seja difícil identificar o fenótipo de interesse devido à reduzida resposta de memória – Figura 2 (Casanova e Abel, 2002).

Um dos aspectos mais bem estudados nas micobactérias é a estrutura e função da sua parede celular (Figura 3), que lhes confere a sua capacidade única de resistirem à descoloração com uma solução álcool-ácido, daí serem diferencialmente coradas pela coloração de Ziehl - Neelson. A parede celular é composta por uma variedade de proteínas solúveis, carboidratos e lípidos (componentes característicos da parede celular da maioria das bactérias) e por dois tipos de lipopolissacarídeos (LPS): um deles é composto por três componentes macromoleculares insolúveis, o arabinogalactano, o peptidoglicano e o ácido micólico; o outro lipopolissacarídeo é o lipoarabinomanano (Inderlied *et al.*, 1993).

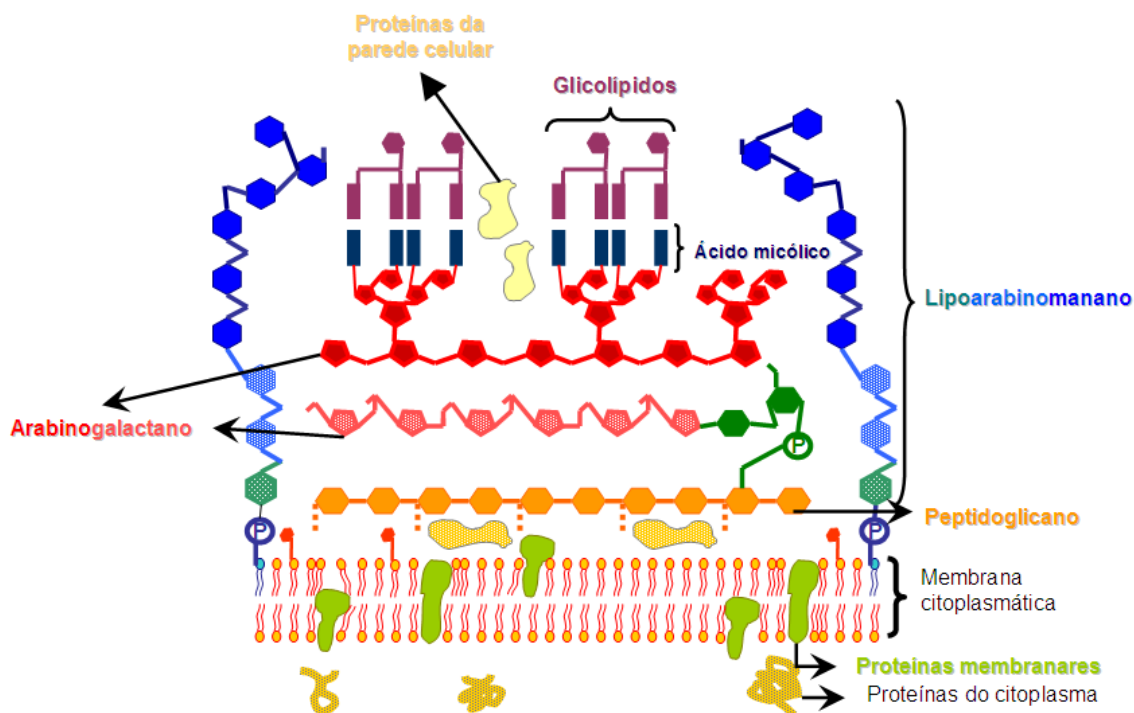


Figura 3 - Representação esquemática da parede celular das micobactérias.

(Adaptado de Inderleid *et al.*, 1993)

As micobactérias da espécie *avium* juntamente com as da espécie *intracellulare* constituem o chamado Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) (Field, 2004).

De acordo com os critérios de classificação desenvolvidos por Runyon e outros (1950), as micobactérias pertencentes a este complexo são classificadas como bacilos álcool-ácido resistentes, de crescimento lento, que podem produzir pigmentos amarelos na ausência de luz. O complexo *M. avium* é composto por bactérias patogênicas oportunistas capazes de causar doença tanto em animais como humanos (Inderleid *et al.*, 1993). A resistência de *M. avium* a processos comuns de desinfecção é bastante elevada já que esta bactéria tem capacidade de crescer num grande intervalo de temperatura, pH, salinidade e pressão de oxigênio, o que leva à persistência deste agente em sistemas de água potável (Falkinham, 1996).

Como as bactérias da espécie *M. avium* são ubíquas no ambiente, a sua interação com o Homem é bastante frequente. No entanto, ao contrário de *M. tuberculosis*, estas bactérias são agentes infecciosos oportunistas, e por isso causam doença essencialmente em indivíduos com um sistema imunitário enfraquecido, especialmente em doentes com SIDA (Field, 2004). A infecção oportunista por *M. avium* geralmente ocorre em estados avançados da doença (SIDA), quando o número

de células T CD4⁺ existentes no sangue é menor que 50 células por mm³ (Appelberg, 2006).

2. Resposta imunitária à infecção por micobactérias

A infecção por agentes patogénicos intracelulares, como é o caso das infecções por micobactérias, é controlada, na maioria dos casos, pela resposta imunológica mediada por células (resposta inata). O primeiro encontro entre o sistema imunológico do hospedeiro e as bactérias invasoras é a ligação e reconhecimento das micobactérias por parte das células dendríticas e macrófagos via receptores de reconhecimento inato padrão (Ottenhoff *et al.*, 2005).

Entre as 2 e as 6 semanas após a infecção, é desenvolvida uma resposta imune mediada por células (Raja, 2004; Salgame, 2005). A entrada de antígenos microbianos nos tecidos periféricos e a sua migração para os gânglios linfáticos é o primeiro passo para o aparecimento de uma resposta imune adaptativa. Subsequentemente, a apresentação dos antígenos a células T “naive” no contexto do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) induz a activação e diferenciação das células T – Figura 5 (Netea *et al.*, 2005).

Assim, como resposta à fagocitose das micobactérias, os macrófagos e células dendríticas libertam interleucina-12 (IL-12), a principal citocina activada na resposta inata (Trinchieri, G., 1997). Esta citocina, por sua vez, activa as células NK (*natural killer cells*), que produzem IFN- γ , e desempenha um papel chave no controlo da activação, diferenciação e expansão dos linfócitos Th1 (“T helper-1 cells”) específicas para este agente patogénico. Subsequentemente, a IL-12 induz a produção de IL-10 nos linfócitos e fagócitos, e por sua vez a IL-10 inibe ou regula a produção de IL-12. A IL-10 activa também os linfócitos Th2 (Trinchieri, G., 1997).

Quando a resposta adaptativa Th1 é activada, verifica-se a formação de granulomas, conjunto de macrófagos, células T, células B e fibroblastos que rodeiam os locais primários de infecção (Raja, 2004; Salgame, 2005).

Estas células (Th1) são a maior fonte de IFN- γ durante a resposta imune adquirida e são necessárias para o controlo da fase crónica da infecção (Ottenhoff *et al.*, 2005). A resposta imune Th1 no granuloma é geralmente suficiente para controlar a infecção e prevenir a doença activa nos indivíduos, mas é incapaz de erradicar completamente a infecção (Salgame, 2005). As bactérias dentro dos granulomas podem-se encontrar num estado de dormência não replicativo, a replicarem-se activamente mas controladas pelo sistema imunológico ou alteradas metabolicamente

com ciclos de replicação limitados ou pouco frequentes. O colapso da resposta imune para o controlo da infecção pode resultar na reactivação e replicação dos bacilos e consequentes danos e necrose dos tecidos infectados (Flynn, 2001).

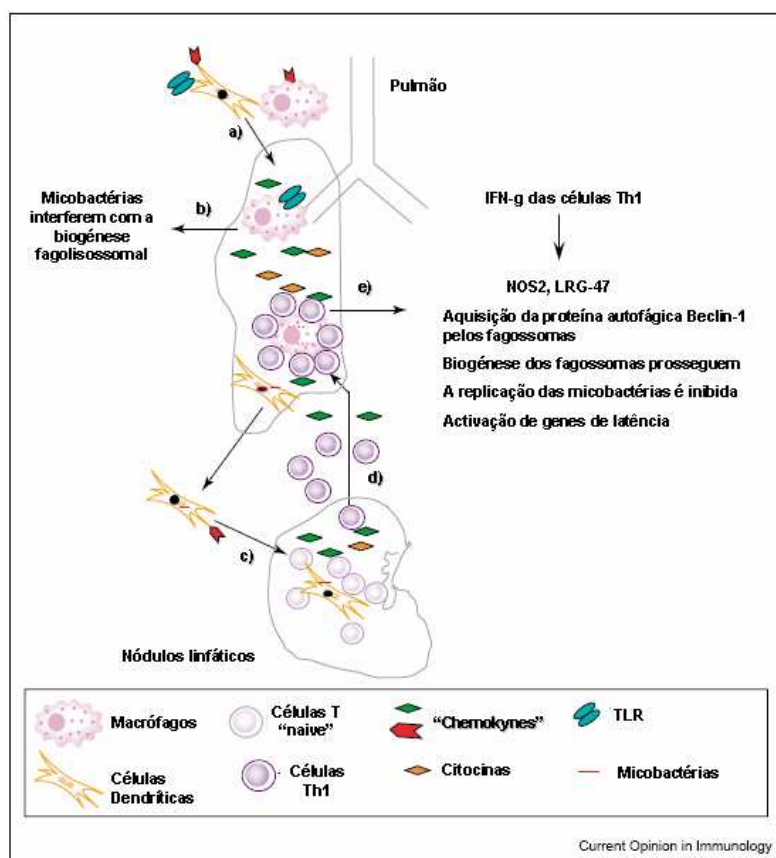


Figura 4 - Vista esquemática das respostas imunes inata e adaptativa que controlam a infecção por micobactérias. a) Recrutamento de células dendríticas e macrófagos para o pulmão; b) as micobactérias bloqueiam a biogénese dos fagossomas; c) migração de células dendríticas para os nódulos linfáticos circulantes; d) iniciação da resposta Th1 e recrutamento de células Th1 para os pulmões induzindo a formação de granulomas; e) maturação dos fagossomas induzida pelo IFN- γ (retirado de Salgame, 2005).

A IL-12 e o IFN- γ actuam nos linfócitos e macrófagos para estimular a produção de IL-2, TNF (*tumor necrosis factor*) e outras citocinas e espécies reactivas intermediárias oxidativas, tais como o superóxido e o óxido nítrico, que participam na defesa do hospedeiro contra as micobactérias (Figura 4). O IFN- γ diminui o pH dentro dos fagossomas e aumenta as concentrações intracelulares de macrólidos e fluoroquinolonas; aumenta também a exibição de antígenos de MHC de superfície e de receptores Fc e activa kinases que, por sua vez, activam factores de transcrição (Field, 2004).

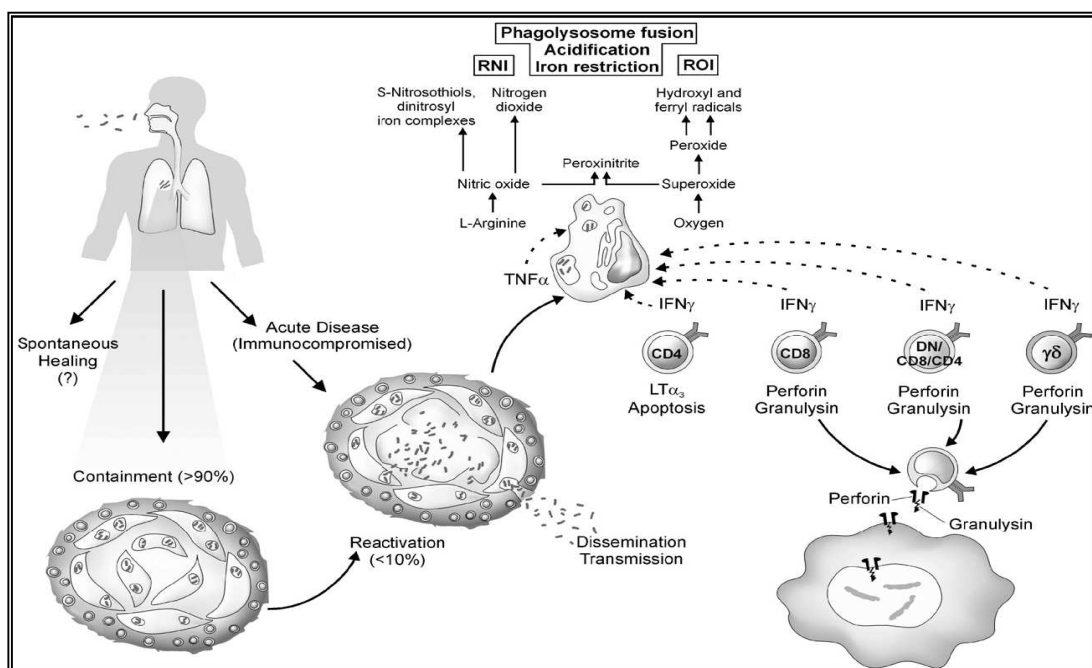


Figura 5 – Principais células e mecanismos envolvidos na resposta à infecção por *M. tuberculosis*. À esquerda, o decurso da infecção e a formação de lesões granulomatosas; À direita, em baixo, as principais populações de células T e os seus mecanismos efectores de resposta à infecção; à direita, em cima, principais mecanismos efectores dos macrófagos (Kaufmann, 2003)

A imunidade às micobactérias tem sido extensivamente estudada em vários modelos animais. O maior avanço neste estudo foi feito utilizando o murgancho como modelo, particularmente desde a infecção de uma série de animais *knockout* com BCG, *M. tuberculosis* e *M. avium*. Estes estudos permitiram estabelecer a contribuição relativa de vários grupos de células (tais como as células T CD4 e CD8 α/β e γ/δ) para a destruição das micobactérias pelos macrófagos, e identificar moléculas envolvidas no reconhecimento (ex. Tlr2), regulação (ex. IL-12, IFN- γ , TNF) e processos efectores das células infectadas (ex. NO) (Casanova e Abel, 2002).

3. Importância dos modelos animais no estudo de infecções por micobactérias

Com o intuito de compreender melhor a resposta imunológica à infecção criando uma base de conhecimento que permitirá desenvolver novas terapias e vacinas, é necessário haver um conhecimento detalhado dos eventos que ocorrem num hospedeiro após uma infecção. Cada vez mais, torna-se indispensável o uso de modelos animais para a compreensão detalhada da dinâmica das interações entre o agente patogénico e hospedeiro ou das complexas interações entre os diferentes tipos de células e órgãos que estão envolvidos na resposta do hospedeiro à infecção.

O murganho tem-se mostrado um animal muito útil para a compreensão de doenças humanas infecciosas. Apesar de existirem muitas diferenças, os componentes essenciais do sistema imunitário dos murganhos e dos humanos são bastante similares (ambos são susceptíveis à infecção por micobactérias), sendo muitas vezes as descobertas feitas em murganhos verificadas posteriormente em humanos (Jan Buer e Rudi Balling, 2003; Kaufmann, 2003). O murganho é também o modelo animal que apresenta melhor relação custo/eficiência no estudo da infecção por micobactérias (Kaufmann, 2003).

Outra vantagem no uso do murganho como modelo animal de estudo de infecções por micobactérias é a possibilidade da manipulação do seu genoma. A expressão transgênica, o *knock-in* e o *knock-out* de genes tornaram-se tecnologias padrão, estando disponível uma grande variedade de murganhos mutantes para o estudo do papel de células distintas e moléculas de superfície no sistema *in vivo* de infecção por micobactérias. Genes humanos podem também ser expressos ectopicamente em murganhos transgênicos, permitindo que os traços que influenciam a susceptibilidade à infecção sejam “humanizados” (Jan Buer e Rudi Balling, 2003; Kaufmann, 2003).

Na investigação de doenças infecciosas, a maioria dos estudos foram focados nos genes que codificam as citocinas e os seus receptores, já que estas são um ponto essencial da resposta imune. Através destes estudos, tornou-se evidente a grande complexidade e a considerável redundância do sistema imunológico (Jan Buer e Rudi Balling, 2003).

Contudo, o murganho é um modelo limitado para uso no estudo da tuberculose, já que *M. tuberculosis* não é uma bactéria natural do murganho e o curso da infecção da tuberculose neste modelo animal não possui algumas características da infecção em humanos; por exemplo, o murganho, ao contrário dos humanos, desenvolve lesões que não são granulomas típicos já que são menos organizados (Pozos e Ramakrishan, 2004).

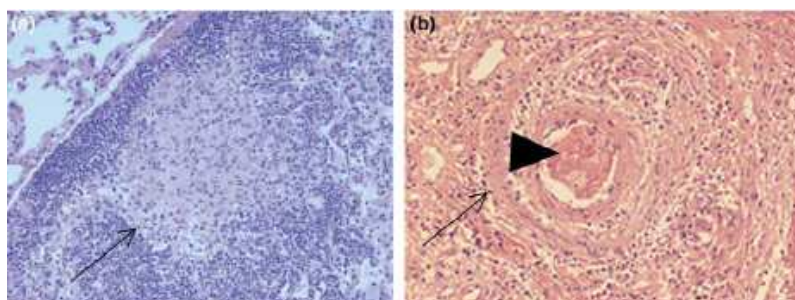


Figura 6 – Exemplo de granulomas de *M. tuberculosis* em murganho e humano. As setas indicam os granulomas enquanto que o triângulo indica um centro acelular caseoso (a) Coloração de hematoxilina - eosina do pulmão de um murganho, 6 semanas após infecção (b) Coloração de hematoxilina - eosina dum pulmão humano (Pozos e Ramakrishan, 2004)

Apesar do grande uso dos murganhos na investigação da infecção e imunidade, é óbvio que, para muitas doenças infecciosas humanas, não existem ainda modelos animais suficientemente representativos das mesmas, e será necessário um desenvolvimento sistemático de novos modelos de murganhos para o estudo de doenças infecciosas. O conhecimento detalhado acerca da influência do fundo genético em certos fenótipos, como a imunidade à exposição de agentes patogénicos, será extremamente importante para seleccionar murganhos para este fim.

Um dos aspectos mais intrigantes nas doenças infecciosas é o facto de se estar a lidar com o processo de interacção de genomas. Os genes que determinam a virulência de um agente patogénico operam num ambiente genético de susceptibilidade ou resistência dos genes do hospedeiro. O murganho é então um modelo animal essencial para a análise pormenorizada dos mecanismos moleculares e celulares das interacções entre o hospedeiro e o agente infeccioso, já que se dispõe actualmente de excelentes ferramentas genéticas para este efeito (Buer e Balling, 2003).

Neste contexto, pretendeu-se neste trabalho usar o murganho como modelo animal para o estudo da infecção por micobactérias, mais concretamente por *Mycobacterium avium*, recorrendo às técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica para identificação das células infectadas e a um modelo transgénico para um TCR $\alpha\beta$ para o estudo da resposta à infecção por esta micobactéria.

V – OBJECTIVOS

Os **objectivos** deste trabalho foram:

- A optimização do PCR para genotipagem de uma linha de murganhos transgénicos para a cadeia α e β dum TCR;
- Estudo da expressão dos genes $V\alpha 11$ e $V\beta 10$ na linha de murganhos transgénicos (myc TCR);
- Estudo da resposta à infecção por *M. avium* da linha myc TCR;
- Optimização da marcação de macrófagos e micobactérias através de técnicas de imunohistologia em tecidos infectados com *M. avium*.