

Centro de Citologia Experimental e
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
da Universidade do Porto

Anabela Teixeira Prata de Castro

Aspectos da Resposta Imunológica Inespecífica à Infecção

Porto, 1996



Centro de Citologia Experimental e
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
da Universidade do Porto

Anabela Teixeira Prata de Castro

**Aspectos da Resposta Imunológica
Inespecífica à Infecção**

Porto, 1996

7196

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE IMUNOLOGIA, APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO.

ORIENTADOR: Doutor Artur Águas (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto).

CO-ORIENTADOR: Doutor Manuel Teixeira da Silva (Faculdade de Medicina e Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Teixeira da Silva por me ter acolhido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro de Citologia Experimental de que é responsável, e pelas discussões científicas estabelecidas ao longo deste trabalho.

O meu especial agradecimento ao Professor Artur Águas pelo seu espírito aberto e crítico, e o seu encorajamento durante a realização deste trabalho. Sem o seu entusiasmo, o seu apoio e as muitas discussões este trabalho não teria sido possível.

O meu sincero reconhecimento ao Professor António Coutinho por me ter recebido no Laboratório de Imunobiologia do Instituto Pasteur, de que é responsável, onde parte desta tese foi elaborada. Foi para mim um privilégio ter trabalhado num laboratório de níveis científico e humano de excepção, sob a orientação criativa, generosa e abrangente do Professor António Coutinho.

Os meus agradecimentos ao Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, na pessoa do seu director Professor Alexandre Quintanilha, Instituição em que realizei parte da componente experimental desta dissertação.

Quero também agradecer aos co-autores dos trabalhos apresentados nesta dissertação: Alberto Nóbrega, António Bandeira, Nair Esaguy, Paolo Truffa-Bachi e Véronique Bemer.

O meu muito obrigado à Olga Lage, pelo apoio na execução gráfica desta dissertação.

Os meus agradecimentos pelo apoio e disponibilidade a todos os membros do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Centro de Citologia Experimental sem esquecer as técnicas auxiliares de laboratório e biotério.

Finalmente, gostaria de agradecer à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica pela bolsa de doutoramento concedida no período em que realizei o trabalho experimental aqui contido.

Ao abrigo do disposto no parágrafo número dois do artigo oitavo do Decreto-lei nº 388/70, foram incluídos nesta dissertação os seguintes artigos publicados ou submetidos para publicação:

Castro, A. P., Águas, A. P. & Silva, M. T. 1993. Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice. *Clinical and Experimental Immunology* **92**: 466-472.

Castro, A. P., Esaguy, N. & Águas, A. P. 1993. Effect of mycobacterial infection in lupus-prone MRL/lpr mice: enhancement of life span of autoimmune mice, amelioration of kidney disease and transient decrease in host resistance. *Autoimmunity* **16**: 159-166.

Castro, A. P., Bandeira A., Águas, A. P., Coutinho, A. & Nóbrega, A. 1996. Secondary participation of CD4 and CD8 T cells following endotoxin administration to mice (submetido).

Castro, A. P., Bemer, V., Truffa-Bachi, P., Nóbrega, A. & Coutinho, A. 1996. Extensive T cell activation and apoptosis following exposure to endotoxin from Gram-negative bacteria (submetido).

Preâmbulo

Mais de um século já decorreu desde que foi demonstrado o papel etiológico de microrganismos em patologias humanas, as quais passaram a ser conhecidas como doenças infecciosas. A título de exemplo, podemos recordar que foi comemorado há poucos anos o primeiro centenário da identificação por Robert Koch do agente causador da tuberculose pulmonar humana, o *Mycobacterium tuberculosis*.

Cedo foi entendido pelos microbiologistas do século passado que os mamíferos são possuidores de mecanismos fisiológicos que lhes permitem controlar a esmagadora maioria das infecções a que estão sujeitos. O optimismo reinava entre os cientistas do final do século XIX quanto a um rápido progresso na compreensão do funcionamento do sistema de defesa contra as infecções, avanço este que era visto como podendo vir a possibilitar a prevenção e o tratamento de todas as doenças infecciosas, como foi antecipado por Paul Ehrlich e seus pares.

Um século depois podemos afirmar que, se por um lado a manipulação da resposta imunológica por métodos de vacinação se veio a revelar eficaz na prevenção de algumas doenças infecciosas, a verdade é que, por outro lado, o assinalável avanço da ciência imunológica ainda não resultou no desenvolvimento de intervenções que, modificando apenas a imunofisiologia do hospedeiro, possam ser utilizadas como medidas terapêuticas curativas da maioria das infecções que atingem o Homem.

Há actualmente legítima esperança de que em breve venha a ser possível tratar um número crescente de doenças infecciosas alterando apenas alguns dos componentes celulares e moleculares do sistema imunitário, nomeadamente manipulando o equilíbrio entre subpopulações de linfócitos T ou modificando a concentração de citocinas.

Podemos dizer que no novo virar de século que se aproxima se repete o entusiasmo optimista de Robert Koch e Paul Ehrlich de há cem anos atrás. E, no

entanto, ainda morrem anualmente três milhões de seres humanos devido a tuberculose, a doença infecciosa mais mortífera para a humanidade dos nossos dias e mesmo no país científica e tecnologicamente mais avançado do nosso tempo, os Estados Unidos da América, ainda anualmente mais de 100.000 pessoas são vítimas mortais de choque séptico causado por bactérias Gram-negativas.

O estado actual dos conhecimentos de Imunologia é portanto, ainda insuficiente para oferecer terapêuticas eficazes no combate de número elevado de patologias infecciosas, nomeadamente nas duas situações citadas no parágrafo anterior as quais, como o leitor adiante verá, foram por mim utilizadas para estudar aspectos da resposta inata do hospedeiro à infecção.

Necessário é prosseguir a investigação da resposta imunológica a infecções que afligem o Homem. Participar neste esforço científico foi o objectivo que me guiou quando decidi iniciar o meu programa de doutoramento. Este programa teve como objectivo o estudo de mecanismos não específicos da resposta imunológica, os quais foram por mim investigados em roedores injectados com micobactérias ou com lipossacarídeo de bactérias Gram-negativas. Sendo o sistema imune organizado no sentido do desencadeamento de respostas de elevada especificidade, não admira que a indução por agentes infecciosos de respostas imunológicas inespecíficas tenha tendência a receber relativa pouca atenção por parte dos imunologistas da infecção. Esta dissertação pretende documentar o papel importante que mecanismos inespecíficos despertados por agentes infecciosos têm não só na resposta de defesa do hospedeiro como na modulação do seu sistema imunológico.

Os estudos experimentais contidos nesta dissertação foram realizados sob a orientação do Doutor Artur Águas, no Laboratório dirigido pelo Doutor Manuel Teixeira da Silva no Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, e do Professor Doutor António Coutinho no seu Laboratório no Instituto Pasteur.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Infecções por Micobactérias	3
1.2. O Lipopolissacarídeo (LPS) das Bactérias Gram-negativas	10
1.3. Activação de Linfócitos T	20
1.4. Apoptose	25
1.5. Súmula de Objectivos	33
 2. Estudos Experimentais	 35
2.1. "Adjuvant treatment increases the resistance to <i>Mycobacterium avium</i> infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice"	36
2.2. "Effect of mycobacterial infection in lupus-prone MRL/lpr mice: enhancement of life span of autoimmune mice, amelioration of kidney disease and transient decrease in host resistance"	37
2.3 "Secondary participation of CD4 and CD8 T cells following endotoxin administration to mice."	38
2.4. "Extensive T cell activation and apoptosis, following exposure to endotoxin from Gram-negative bacteria."	39
2.5. "Experiments aiming at the definition of the mechanisms of the <i>in vivo</i> activation of T lymphocytes caused by LPS"	40
 3. Discussão	 41
 4. Bibliografia	 65
 5. Conclusões	 82
 6. Resumos	 85

1. Introdução

Índice do Capítulo

1.1. Infecções por Micobactéria	3
Imunidade Inespecífica	3
Infecções por Micobactérias	4
Complexo do <i>Mycobacterium avium</i>	5
Susceptibilidade e Resistência de Ratinhos a Infecções por Parasitas Intracelulares e o Gene <i>Bcg</i>	6
O ratinho MRL- <i>lpr</i>	7
Metchnikoff, Inflamação e a Teoria da Fagocitose	9
 1.2. O Lipopolissacarídeo (LPS) das Bactérias Gram-negativas	 10
Sepsis por Gram-negativas	10
Estrutura do LPS	12
O LPS como Adjuvante	12
As Proteínas da Fase Aguda	13
Distribuição, Captação e Depuração do LPS Circulante	15
Estrutura e Função da Proteína Ligante do LPS (LPB)	16
Estrutura do Receptor CD14	17
Interação do LPS com o Monócito/Macrófago e Produção de Monócinas	18
 1.3. Ativação de Linfócitos T	 20
Células T "Naive", de Memória e Efectoras	21
O Receptor da Célula T (TCR)	22
Ativação Via CD2 e CD28	23
CD69, Antígeno Precoce de Ativação	24
 1.4. Apoptose	 25
Conceito de Necrose	25
Morte Celular Programada	26
Morte Celular Programada e Apoptose	27
Alterações Estruturais	28
Apoptose Via Receptor <i>Fas</i>	29
Infecção e Regulação da Apoptose	30
 1.5. Súmula de Objectivos	 33

Na presente dissertação os resultados experimentais são apresentados sob a forma de componentes de artigos científicos, os quais estão organizados segundo a sua estrutura clássica, ou seja, incluindo, para além das secções de "Materiais e Métodos" e "Resultados", uma curta "Introdução" e uma "Discussão" apoiada em referências bibliográficas. Deste modo, cada um dos capítulos que contém dados experimentais pode ser considerado como uma unidade, a qual inclui também apreciação do significado dos mesmos resultados. Este facto leva a que o capítulo de "Discussão" desta dissertação, que se apresenta no final deste volume, se tenha confinado a uma avaliação geral do significado dos dados experimentais obtidos, em vez de constituir análise crítica detalhada e individual de cada um dos resultados, o que é, como disse atrás, feito em cada componente do capítulo 2 que contém resultados originais por mim obtidos.

Tendo em conta o tipo de organização que adoptei para a minha dissertação, considereei que seria adequado apresentar como primeiro capítulo deste volume uma revisão breve dos conceitos fundamentais que são abordados ou fundamentam o trabalho experimental que realizei e cujos objectivos principais estão enumerados nas páginas anteriores.

1.1. Infecções por Micobactérias

Imunidade Inespecífica

Nesta dissertação empregamos o conceito de imunidade inespecífica como denominando o conjunto da respostas produzidas pelo sistema imunológico que não envolvem reconhecimento específico do antígeno, tal como é habitualmente definido em vários manuais de Imunologia (Roitt, 1991; Abbas *et al.*, 1991). Quando aplicado à infecção, o conceito de imunidade inespecífica ou inata, corresponderá ao componente da resposta do hospedeiro que não envolve a participação de anticorpos ou de linfócitos T específicos para antígenos dos microrganismos. Fazem parte, portanto, da

imunidade inespecífica fenômenos como o aumento do número de granulócitos polimorfonucleares não dependente de linfócitos T, e a activação policlonal de linfócitos T, situações a que é dedicada particular atenção no componente experimental contido neste volume (Capítulo 3). Não se deve esquecer, no entanto, que a chamada de neutrófilos a locais de infecção, quando feita numa segunda fase em que já foi montada resposta específica ao agente infeccioso, pode estar dependente dos linfócitos T, situação esta em que a acumulação de neutrófilos não poderá ser já considerada como fazendo parte da imunidade inespecífica (Appelberg & Silva, 1989; Appelberg 1992a).

Infecções por Micobactérias

As doenças causadas no Homem por micobactérias podem dividir-se em três categorias: tuberculose (TB), lepra e doenças induzidas por micobactérias não tuberculosas (MNT) também conhecidas como micobactérias atípicas. Nos últimos anos, as infecções por MNT têm ganho particular relevância nos países desenvolvidos devido à sua associação com fases avançadas de SIDA. O aparecimento do SIDA resultou também em aumento do número de casos de TB em todo o mundo, particularmente nos países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Nos países desenvolvidos a TB deixou de ser endémica; nos casos de SIDA encontram-se sobretudo infecções sistémicas oportunistas causadas pelas MNT, particularmente devidas a bactérias pertencentes ao complexo do *M. avium* (MAC) (Young, 1988). Recentemente a TB voltou a tornar-se de numa infecção temível nos países do primeiro mundo devido ao aparecimento de estirpes do bacilo de Koch que são resistentes a todos os fármacos antimicobacterianos conhecidos (Bloom & Murray, 1992).

Nos últimos dez anos observou-se uma marcada redução no número global de doentes infectados com *M. leprae* devido à aplicação de regimes terapêuticos combinando várias drogas e que têm sido patrocinados pela Organização Mundial de Saúde desde há várias décadas (WHO, 1982). Tanto na TB como na lepra, as micobactérias infectantes parecem ter como reservatório natural apenas o Homem, sendo portanto o agente infeccioso transmitido de pessoa para pessoa. Bacilos de *M.*

leprae foram também isolados a partir de armadillos mas estes animais não parecem ser fonte de contaminação de humanos. Pelo contrário, o reservatório de MNT parece ser essencialmente ambiental. A maior parte das infecções por MNT são resistentes às drogas antimicobacterianas que têm tido sucesso no tratamento da TB e da lepra (Davidson *et al.*, 1981).

Dado que as MNT estão largamente distribuídas no meio ambiente em que o Homem se insere, não é surpreendente que possam ocasionalmente colonizar as superfícies mucosas humanas, sem que isso cause doença em indivíduos sem prévias alterações imunitárias. As MNT têm sido identificadas em secreções presentes na nasofaringe, nos brônquios e na mucosa intestinal de indivíduos imunocompetentes e saudáveis (Tsang *et al.*, 1992). Estas colonizações devem ser resultado de inalação de aerossóis contaminados (Wendt *et al.*, 1980) ou ingestão de comida ou água contaminada por estas micobactérias (Wallace, 1987).

Habitualmente as infecções por MNT não são contagiosas, o seu desenvolvimento favorecido pela coexistência de problemas médicos vários, nomeadamente os que resultam de perda de imunocompetência. Doenças debilitantes, infecção por outros agentes infecciosos ou operações de grande cirurgia podem ajudar as MNT a causar doença no Homem

Complexo do *Mycobacterium avium* (MAC)

O MAC é composto por agentes patogénicos oportunistas para o Homem mas com capacidade de indução de doença em aves e em algumas estirpes de roedores. São o grupo mais importante das atrás citadas MNT. As bactérias que pertencem ao MAC correspondem a bacilos álcool-resistentes, de crescimento lento, que produzem um pigmento amarelo na ausência de luz. O MAC é serologicamente um complexo de 28 serótipos (Denner *et al.*, 1992). Encontram-se descritos três tipos morfológicos de colónias de MAC em crescimento em meio sólido: (i) lisas e opacas, (ii) lisas e transparentes e (iii) rugosas.

Bacilos de MAC isolados de doentes com SIDA aparecem frequentemente sob a forma de colónias lisas transparentes ou lisas opacas ou como uma mistura de ambas (Tsang *et al.*, 1992). As variantes de colónias transparentes são geralmente as mais resistentes a agentes antimicrobianos, o que é evidenciado tanto em estudos *in vitro* com macrófagos, como em modelos animais de infecção (Inderlied *et al.*, 1993).

Apesar de existirem diferenças na expressão de antígenos entre colónias transparentes e opacas (Thorel & David, 1984), essas diferenças ainda não foram claramente correlacionadas com a resistência ou patogenicidade das micobactérias. Também pouco é ainda conhecido sobre a genética e a regulação da variação do tipo de colónia de MAC.

Susceptibilidade e Resistência a Infecções por Parasitas Intracelulares e o Gene *Bcg*

No ratinho a resistência ou susceptibilidade à infecção por micobactérias (e outros parasitas intracelulares) faz-se sob apertado controlo genético (Forget *et al.*, 1981; Skamene *et al.*, 1984; Goto *et al.*, 1989). Em estirpes de ratinhos "inbred" a infecção por *M. bovis* Calmette-Guérin (BCG) é bifásica, com uma fase inicial considerada inespecífica, ou seja dependente da resposta inicial do hospedeiro, que ocorre nas primeiras 2-3 semanas e se caracteriza por proliferação das bactérias no fígado e no baço dos ratinhos susceptíveis a infecção pelo BCG, enquanto que nos ratinhos naturalmente resistentes ao mesmo bacilo se regista uma ausência de crescimento bacteriano nos mesmos órgãos alvo da infecção micobacteriana (Gros *et al.*, 1981).

A fase seguinte da infecção murina pelo BCG torna-se evidente entre as 3 e as 6 semanas e está associada a resposta imune específica conduzindo a uma redução clara da carga bacteriana nos órgãos alvo (fígado e baço) dos ratinhos resistentes ou, a uma infecção persistente nos órgãos dos ratinhos susceptíveis à micobactéria (Pelletier *et al.*, 1982).

Existe uma diferença determinante no controlo genético da infecção pelo BCG entre a primeira e a segunda fase. A primeira fase da infecção é controlada pela expressão de um só gene dominante localizado no cromossoma 1 e denominado

como *Bcg* (Gros *et al.*, 1981). Este gene está presente em duas formas alélicas nas estirpes "inbred" conhecidas como *Bcg*^r (resistente, dominante) e nas denominadas de *Bcg*^s (susceptível, recessivo). A expressão do gene *Bcg* afecta a capacidade dos macrófagos destruírem intracelularmente micobactérias durante a fase inicial da infecção. Na segunda fase da infecção, o controlo da mesma pelo hospedeiro está dependente de outros genes, nomeadamente de genes associados ao complexo maior de histocompatibilidade (Hormaeche *et al.*, 1985; Brett *et al.*, 1992). Aquele que se presume ser o gene *Bcg* foi clonado pelo grupo de Skamene em 1993 e foi denominado de *Nramp* (Vidal *et al.*, 1993). Foi postulado por este grupo que seria a expressão de *Nramp* no macrófago que iria condicionar a expressão de resistência ou susceptibilidade dos ratinhos às micobacterioses, tendo sido postulado que o *Nramp* codifica uma proteína da membrana do macrófago a qual tem a ver com o grau de activação do fagócito.

Existe, no entanto, evidência de que a resistência inata de ratinhos relativamente a outras micobactérias, como o *M. tuberculosis*, não depende exclusivamente da expressão do gene *Bcg* nos macrófagos mas também da actividade de outras células como os linfócitos da subpopulação "natural killer" (NK) (Harshan & Gangadharam, 1991).

O Ratinho MRL-*lpr*

É interessante referir desde já que os ratinhos MRL-*lpr* apresentam deficiência congénita da resposta por neutrófilos a estímulos inflamatórios (Gersham *et al.*, 1991); tirei partido desta característica num dos meus estudos em que pretendi inicialmente investigar a participação dos neutrófilos na modulação da resistência/susceptibilidade do hospedeiro a infecções por micobactérias. As estirpes "inbred" de ratinhos que desenvolvem espontaneamente uma doença com características semelhantes ao LES humano não derivaram de nenhuma selecção genética cujo objectivo fosse à partida o desenvolvimento de modelos animais de autoimunidade, mas surgiram por puro acaso. Foi isso que se passou com a estirpe

MRL-*lpr* que foi identificada quando se efectuavam cruzamentos com a finalidade de transferir o gene mutante para a acondroplasia, alteração esta não relacionada com o lupus, da estirpe murina AKR, que apresenta leucemia severa, para uma outra estirpe de ratinho com forma atenuada de leucemia. Durante este processo verificou-se a manifestação de outros defeitos congénitos. Para poder viabilizar estas anomalias os ratinhos foram cruzados com diversas estirpes "inbred" saudáveis que deram origem à estirpe MRL. Após a 12ª geração de cruzamentos verificou-se que alguns ratinhos desenvolviam linfadenopatia, enquanto outros não. Estes dois tipos de ratinhos foram separados e cruzados com vista a obter animais "inbred" dando origem aos ratinhos MRL+/+ (sem adenopatias) e com a mutação *lpr* (com adenopatias).

O gene *lpr* foi transferido para o "background" genético de diversas estirpes "inbred", nomeadamente C57BL/6, BALB/c, C3H/HeJ, AKR, C57BL/10 e SJL. Apesar destas estirpes com o gene *lpr* produzirem autoanticorpos patogénicos nenhuma delas desenvolve com a mesma severidade as lesões imunopatológicas do lupus que são observados nos ratinhos MRL-*lpr* (Theofilopoulos & Dixon, 1985).

Os ratinhos da estirpe MRL com mutação homozigótica para o gene *lpr* desenvolvem espontaneamente uma marcada linfadenopatia a qual é devida à expansão e acumulação não orgãos linfóides de um fenótipo de linfócitos T, denominado de células duplamente negativas (isto é, sem expressão à superfície dos antígenos CD4 ou CD8) e apresentando aberrantemente antígenos de linfócitos B (como B220 e CD44). Os animais desenvolvem glomerulonefrite, vasculite e uma forma de artrite semelhante à artrite lúpica humana, as lesões das articulações podem começar a aparecer por volta dos dois meses de idade e três a quatro meses mais tarde cerca de 75% dos animais tem sinais histológicos de artrite. Os ratinhos MRL-*lpr* expressam múltiplos indicadores clínicos e serológicos de patologia comum com o LES humano. Machos e sobretudo, fêmeas desenvolvem formas severas da doença sendo detectáveis autoanticorpos patogénicos depois do segundo mês de vida. Têm uma longevidade média de vida de cerca de seis meses (Shultz & Sidman, 1987).

Os gânglios linfáticos de ratinhos MRL-*lpr* com mais de 4 meses de idade são habitualmente hipertróficos devido à acumulação de numerosas células T duplamente negativas que chegam a constituir 90% dos linfócitos do gânglio linfático. Apresentam também hipergamaglobulinemia, anticorpos antinucleares e anti-DNA e deposição sistémica de complexos imunes.

Metchnikoff, Inflamação e a Teoria da Fagocitose

O conceito de inflamação, pertença exclusiva dos patologistas até aos estudos de Elie Metchnikoff, era nos finais do século XIX dominado pelo dogma de que a resposta inflamatória exercia apenas um efeito deletério para o hospedeiro. Apesar dos contributos de Edward Jenner e Louis Pasteur, pouco se sabia sobre os mecanismos responsáveis pelas respostas de defesa que tinham sido induzidas experimentalmente por estes cientistas nos seus bem sucedidos actos de vacinação de humanos e animais contra doenças infecciosas.

Os patologistas da época, dominados pelos conceitos de Rudolf Virchow, consideravam assim as células fagocitárias como meros veículos de transporte de agentes infecciosos, sendo assim vistas como elementos que contribuía sobretudo para a disseminação dos micróbios no organismo. Deste modo se compreende que entendessem o papel dos fagócitos na infecção como participando apenas numa resposta passiva e de consequências nocivas para o hospedeiro infectado.

Foi neste contexto que Metchnikoff elaborou a sua teoria da fagocitose segundo a qual as células fagocitárias eram consideradas a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção, postulando que à ingestão de microrganismos se aliava a capacidade do fagócito digerir e destruir os mesmos agentes infecciosos. Apesar do prémio Nobel que auferiu em 1908, conjuntamente com o seu frequente opositor Paul Ehrlich (defensor da teoria humoral em que nenhum papel relevante era dado aos fagócitos na resistência às infecções), a teoria da resposta celular de Metchnikoff ficou quase esquecida pelos imunologistas durante cerca de meio século. Alguns historiadores da ciência defendem mesmo que daí resultou um período pobre (a primeira metade deste século)

relativamente ao progresso conceptual da Imunologia já que o trabalho experimental na área foi durante esse período exageradamente desequilibrado em favor do estudo da vertente humoral da resposta imune (Silverstein, 1992).

Uma das questões que abordo nesta dissertação é exactamente o papel que o aumento do número de fagócitos, induzido por resposta inflamatória inespecífica, pode ter no controlo de infecção por micobactérias em murganhos que são naturalmente resistentes ou susceptíveis a estes parasitas intracelulares. Trata-se de um problema cuja filiação longínqua pode ser encontrada nos paradigmas enunciados por Metchnikoff há cerca de cem anos.

1.2. O Lipopolissacarídeo (LPS) das Bactérias Gram-negativas

O LPS é um componente estrutural essencial das bactérias Gram-negativas no que diz respeito às alterações imunológicas causadas por estes microrganismos no hospedeiro infectado. Assim, é sabido que esta molécula induz intensa actividade biológica envolvendo marcadas alterações do metabolismo e da expressão génica em tipos variados de células do hospedeiro (Wright & Kolesnick, 1995). Estas acções do LPS resultam em intensa resposta inflamatória compreendendo a chamada de numerosas células fagocitárias para o local da infecção. Enquanto que na infecção local por bactérias Gram-negativas este fenómeno inflamatório será benéfico para o hospedeiro, já que irá ser essencial na destruição das bactérias, pelo contrário a resposta inflamatória sistémica produzida pela entrada de LPS em circulação é uma situação de grande gravidade para o hospedeiro e que lhe é frequentemente fatal.

Sepsis por Bactérias Gram-negativas

As infecções sistémicas ou sepsis por bactérias Gram-negativas são situações agudas cuja gravidade põe em causa a sobrevivência do doente. Tanto a etiologia da sepsis como a composição dos grupos de doentes atingidos por estas situações nos

países desenvolvidos são nos nossos dias de carácter diferente daquilo do que acontecia no passado próximo, isto é antes da época em que se instituiu a terapêutica das infecções por meio de fármacos antibióticos.

De facto, a aplicação precoce de antibioticoterapia veio diminuir drasticamente a frequência com que infecções locais por bactérias Gram-negativas têm a oportunidade de fazerem disseminação por via sanguínea. De igual modo, com o progresso da Medicina, as infecções sistémicas por bactérias Gram-negativas são, com cada vez mais frequência, apenas sequela iatrogénica de tratamentos modernos utilizando tecnologias avançadas que permitem hoje elaboradas intervenções cirúrgicas feitas em doentes debilitados o que não era possível décadas atrás. Nos últimos anos, tornou-se também relativamente frequente a ocorrência de sepsis por Gram-negativas que são resultado da evolução de infecções locais em doentes imunocomprometidos que, como se sabe, aumentaram de número devido à endemia da infecção por vírus HIV.

O choque séptico devido a bactérias Gram-negativas conduz habitualmente a hipotensão que infelizmente pode ser refractária a todas as medidas terapêuticas. A hipotensão sistémica acarreta inadequada irrigação dos tecidos e, ocasionando a sua falência, conduzirá à morte do indivíduo se atingir órgãos com funções vitais. A mortalidade humana por sepsis causada por bactérias Gram-negativas é ainda elevada mesmo nos países mais avançados do globo. Por exemplo, o choque séptico causa cerca de 175 000 óbitos anuais nos EUA. As bactérias Gram-negativas são agentes etiológicos importantes da sepsis em geral, o que é ilustrado pelas estatísticas americanas mostrando que nos EUA estas bactérias causam mais de metade do total de casos clínicos de choque séptico (Wolff, 1991; Stone, 1994).

Pode afirmar-se que a fisiopatologia do choque séptico é resultado de resposta exagerada do organismo ao LPS bacteriano com consequências tóxicas que são induzidas pela resposta do hospedeiro à entrada das bactérias na circulação sanguínea. De facto, na sepsis por bactérias Gram-negativas o LPS tem um papel fundamental devido à sua acção de exagerada estimulação do sistema de defesa com

consequente desencadeamento de uma resposta generalizada que vai conduzir ao quadro clínico de choque séptico. O LPS ou endotoxina não é, no entanto, uma molécula directamente tóxica para os tecidos. Actua induzindo células mielóides e/ou não mielóides a expressarem uma multiplicidade de genes que codificam proteínas, particularmente a citocina TNF- α , as quais medeiam as alterações linfocitárias, hemodinâmicas e hematológicas observadas no choque séptico. Sabe-se que concentrações picomolares de LPS são suficientes para activar células dos sistemas imune, inflamatório e vascular dos mamíferos. O LPS é, portanto, uma das moléculas microbianas de acção biológica de maior potência. Desta característica do LPS se tem tirado partido em Imunologia experimental, nomeadamente através do uso clássico que se faz do LPS como potente estimulador da activação policlonal de linfócitos B *in vitro*.

Apesar da vastidão dos conhecimentos actuais sobre os mecanismos moleculares das acções que são devidas aos mediadores inflamatórios cuja síntese e secreção é induzida pelo LPS, os mecanismos utilizados pelo LPS para induzir activação celular não estão ainda completamente elucidados.

Estrutura do LPS

A molécula é composta por duas regiões: uma hidrofóbica (o lípido A) que está contida no interior da membrana e outra hidrofílica (o antígeno O) que é exposta à superfície da bactéria. Virtualmente todas as respostas biológicas induzidas pelo LPS são dependentes do lípido A (Rietschel *et al.*, 1994) como ficou claramente demonstrado em estudos realizados com lípido A sintético, em que foi possível reproduzir toda a actividade endotóxica do LPS (Takada & Kotani, 1986). A estrutura química do lípido A encontra-se muito conservada nas diversas estirpes de bactérias Gram-negativas (Ulevitch & Tobias, 1995).

O LPS como Adjuvante

A capacidade de adjuvante imunológico do LPS foi descrita pela primeira vez em 1956 por Johnson e colaboradores (Johnson *et al.*, 1956). A partir desse estudo vários

têm sido os mecanismos propostos ao longo das últimas quatro décadas para explicar este fenómeno (Warren *et al.*, 1986). Vários foram os estudos que descreveram que o LPS pode ter uma acção directa sobre os macrófagos, activando-os (Doe & Henson, 1978, Doe *et al.*, 1978).

Existe evidência de que as propriedades adjuvantes do LPS podem derivar da sua capacidade de estimular a síntese e libertação de monocinas como a IL-1. Uma outra hipótese de explicação possível para o efeito adjuvante do LPS é que a molécula actue através da indução do aumento ou diminuição da expressão de moléculas de Ia (moléculas apresentadoras de antígeno do ratinho) à superfície dos macrófagos. Sabe-se, de facto, que exposições curtas de macrófagos *in vitro* ou *in vivo* a LPS induzem uma diminuição da expressão de Ia, enquanto que exposições longas aumentam a expressão de Ia (Warren *et al.*, 1986).

O LPS também apresenta efeitos directos sobre os linfócitos B. É classicamente considerado como o mitogénio policlonal B por excelência actuando independentemente da resposta por linfócitos T (Gery *et al.*, 1972). A endotoxina estimula a produção de anticorpos naturais quando é administrada sem antígeno e de anticorpos específicos quando administrada com antígeno, o que ilustra de novo o seu forte efeito adjuvante (Seppala & Makela, 1984). O LPS estimula também a imunidade de celular como foi documentado em estudos de hipersensibilidade retardada (DTH) (Ohta *et al.*, 1982). As propriedades biológicas do LPS, incluindo a sua acção de adjuvante, residem na porção A da molécula. Investigações feitas com compostos sintéticos de lípido A reproduzem muitas das inúmeras propriedades biológicas do LPS como são o fenómeno de Schwartzman, pirogenicidade, mitogenicidade e letalidade da molécula (Tanamoto *et al.*, 1984).

As Proteínas da Fase Aguda

A fase aguda da resposta inflamatória é caracterizada por um rápido ajuste na concentração de diversas proteínas plasmáticas em resposta a estímulos nóxicos como são a infecção, queimadura, trauma e neoplasia. As APRs ("Acute Phase Reactants")

compreendem um grupo de moléculas de onde se podem destacar a proteína C reactiva, o componente sérico amilóide P e a proteína amilóide sérica A (Steel & Whitehead, 1994).

Esta resposta é caracterizada nos mamíferos por febre e alterações da permeabilidade vascular, assim como por modificações nos perfis de biossíntese, metabolismo e catabolismo de diversos órgãos. A resposta é iniciada e coordenada por diversos mediadores inflamatórios que incluem glucocorticóides, citocinas e anafilotoxinas. Alguns destes mediadores inflamatórios são inicialmente libertados no local da inflamação por fagócitos mononucleares, linfócitos ou outros tipos celulares, exercendo potente efeito local e sistémico. Existem também as designadas APRs negativas da fase aguda da resposta inflamatória, cuja concentração decresce no plasma (de que são exemplo a albumina e a transferrina) assim permitindo um aumento da capacidade de produção no fígado de APRs. De facto, um dos aspectos mais importantes da fase aguda da resposta inflamatória é a dramática alteração da síntese de proteínas plasmáticas pelo fígado, cujo perfil é em situações normais mantido a níveis muito estáveis. Praticamente todas as proteínas da fase aguda são produzidas no fígado; no entanto algumas podem ser produzidas por outros tipos celulares como monócitos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos.

Os glucocorticóides actuam fundamentalmente como agentes imunossuppressores e anti-inflamatórios através de vários mecanismos. Têm como células alvo os leucócitos mononucleares, com particular incidência nos linfócitos, monócitos e macrófagos. Os glucocorticóides intervêm na modulação da resposta imune e inflamatória através da alteração do perfil de produção de citocinas. Em geral, os glucocorticóides suprimem a produção excessiva de citocinas durante uma resposta imune ou inflamatória exacerbada. Encontram-se descritos na literatura os efeitos de inibição da produção de IFN- γ , IL2, IL-3 e IL-6 pelos linfócitos T, assim como a supressão da produção de monócinas que incluem GM-CSF, IL-1 e TNF- α (Goulding & Guyre, 1993). Foi mesmo proposta, como função fisiológica primordial e mais permanente dos glucocorticóides, a

protecção do organismo contra a exacerbação dos mecanismos de defesa induzida em resposta a situações de stress (Munk *et al.*, 1984).

De entre os vários factores solúveis que iniciam e mantêm a resposta inflamatória no Homem, existem alguns mediadores plasmáticos que regulam especificamente a transcrição das proteínas de fase aguda. Pertencem a este grupo as seguintes moléculas: IL-1, IL-6, TNF- α , LIF ("Leukemia Inhibitory Factor") TGF- β , IFN- γ , assim como a IL-11, CNTF ("Ciliary Neutrotrophic Factor") e o ácido retinóico. Uma característica importante da fase aguda da resposta inflamatória é o facto de a IL-1 e o TNF- α estimularem, por via da sua acção sobre o sistema nervoso central, a síntese de glucocorticóides pelas glândulas suprarrenais, o que vem potenciar o aumento da indução, mediada também pela IL-1 e TNF- α , da síntese das proteínas plasmáticas pelos hepatócitos. Este efeito é coincidente com a "downregulation" da síntese de IL-1 pelos macrófagos, estabelecendo-se assim um "feedback" negativo entre os sistemas nervoso central e imune com vista a reduzir a síntese *de novo* de citocinas.

As proteínas de fase aguda apresentam uma vasta gama de propriedades que contribuem para a defesa do hospedeiro. Actuam, nomeadamente, neutralizando directamente agentes com excessiva acção flogística, contribuindo assim para aumentar a protecção do hospedeiro face a agentes infecciosos. Minimizam deste modo a extensão da destruição tecidular durante a inflamação e participam na reparação e regeneração dos tecidos atingidos, promovendo um rápido retorno à homeostasia.

Distribuição, Captação e Depuração do LPS Circulante

A forma sob a qual a endotoxina é administrada condiciona radicalmente o seu processo de depuração hepática (Cross & Opal, 1995). Assim, se o LPS se apresentar como molécula livre em circulação, a endotoxina será captada directamente pelos hepatócitos, enquanto que se o LPS ocorrer como componente estrutural de bactérias Gram-negativas será ingerido, conjuntamente com as bactérias, pelos macrófagos residentes do fígado, as células de Kupffer presentes nos sinusóides hepáticos (Ge *et*

al., 1994). Estas diferentes vias de depuração hepática do LPS são determinantes no estudo da patogénese da sepsis, bem como na abordagem terapêutica do doente.

A depuração do LPS como molécula livre ocorre através de receptores próprios para a endotoxina que existem à superfície do hepatócito. A depuração mediada por ligação a receptor celular não induz resposta com produção de citocinas, contrariamente ao que ocorre na depuração feita pelas células de Kupffer, em que a endotoxina intacta se liga à célula através do receptor de superfície CD14. As células de Kupffer exercem um papel primordial no desencadeamento da produção das citocinas pró-inflamatórias que são libertadas no decorrer da resposta sistémica ao LPS. As células de Kupffer são as principais células produtoras, a nível do tecido hepático, de IL-1 α ; a IL-6 é produzida no fígado pelos hepatócitos e é induzida pela síntese de IL-1 e TNF (Luster *et al.*, 1994).

As lipoproteínas tem um função fisiológica determinante na depuração do LPS. Estudos feitos em ratinhos transgénicos, com nível duas vezes superiores de lipoproteínas plasmáticas de alta densidade ao de ratinhos aparentados mas de "wild type", mostraram uma resposta atenuada ao LPS, com valores de citocinas inferiores aos ratinhos "wild type" e também menor taxa de letalidade à injeção com LPS (Luster *et al.*, 1994). Estudos feitos com injeção de "chylomicrons" mostraram que estas moléculas protegem os ratinhos da morte induzida por endotoxina; este tipo de protecção parece ser mediado por um aumento da capacidade de depuração do LPS pelos hepatócitos, assim se evitando o seu contacto com os macrófagos, limitando-se desta forma a indução pela endotoxina da produção de monócinas (Harris *et al.*, 1993).

Estrutura e Função da Proteína Ligante do LPS (LBP)

A proteína ligante do LPS, a LBP ("LPS binding protein"), tem um papel crucial no sistema de reconhecimento do LPS nos mamíferos; foi originalmente descrita em coelhos (Tobias *et al.*, 1985) e depois em humanos (Tobias *et al.*, 1986). Pertence ao grupo das proteínas de fase aguda e apresenta uma alta afinidade na sua ligação ao LPS (Tobias

et al., 1986; Schumann *et al.*, 1990). É sintetizada nos hepatócitos sob a forma de péptido simples glicosado, o qual é segregado para o sangue sob a forma de uma glicoproteína de 60 KDa. A LBP liga-se ao LPS na região do lípido A e é sintetizada sob o controlo de citocinas e de hormonas esteróides. A função primordial da LBP é promover a ligação do LPS ao CD14 membranar ou solúvel, após o que ocorre a interacção com o receptor CD14 (Hailman *et al.*, 1994).

Outras proteínas de superfície têm sido propostas como receptores de LPS dada a elevada homologia existente entre a LBP, a BPI ("Bactericidal/Permeability Increasing Protein"), a proteína transportadora do colesterol e a PLBT ("Phospholipid Transfer Protein") (von der Mohlen *et al.*, 1996). No entanto, apenas a LBP e a BPI apresentam elevada afinidade para o LPS e têm capacidade de formação de complexo com a endotoxina. Existem várias proteínas produzidas pelos neutrófilos cuja função é ligarem-se ao LPS e neutralizarem a sua actividade biológica; neste grupo de proteínas incluem-se a proteína catiónica CAP18, a lisozima e a BPI, sendo, no entanto, a BPI a proteína que dentro deste grupo de proteínas se encontra melhor caracterizada quanto ao efeito de neutralização do LPS (Takada *et al.*, 1994). A BPI foi detectada apenas em células da linha mieloide; é componente importante dos grânulos azurófilos dos leucócitos polimorfonucleares (PMN). A sua função principal poderá mesmo ser na defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias Gram-negativas ou contra a endotoxina livre, actuando na digestão intracelular de bactérias que é feita pelos PMNs. Isoladamente, a BPI actua extracelularmente como potente agente bactericida e neutralizador de endotoxina; de facto, quando injectada, a BPI protege os animais contra os efeitos letais tanto das bactérias Gram-negativas como da endotoxina (Elsbach & Weiss, 1993).

Estrutura do Receptor CD14

O CD14 é uma glicoproteína de 55kDa que se pode apresentar na forma solúvel (sCD14) ou ligada à membrana celular (mCD14) (Wright *et al.*, 1990). O gene que codifica o receptor CD14 humano está localizado no cromossoma 5 numa região que contém genes para diversos factores de crescimento e para os seus receptores. O

receptor CD14 (mCD14) foi recentemente identificado como uma proteína membrana ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GP1) que se encontra presente à superfície de monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Hazirot *et al.*, 1993; Hailman *et al.*, 1996).

O CD14 pode também encontrar-se em forma solúvel no soro, sem estar portanto ligado à GP1, podendo induzir células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e a produzirem citocinas após interacção com o complexo LBP-LPS (Pugin *et al.*, 1993). Para além da sua função como receptor de LPS, o mCD14 promove a adesão de monócitos a células endoteliais ou linfócitos T activados; nenhum significado fisiológico destas funções é ainda conhecido. Foi sugerida a existência de um ligando nas células B do CD14. O papel do mCD14 foi demonstrado tanto na activação de células mielóides como na activação de células não mielóides de diversos tipos, como sejam células endoteliais e epiteliais que normalmente não expressam mCD14.

Interacção do LPS com o Monócito/Macrófago e Produção de Monócinas

O LPS produzido pelas bactérias Gram-negativas interage com a proteína ligante do LPS, a LBP, molécula que se encontra no plasma (Tobias *et al.*, 1986). O complexo LPS-LBP liga-se a um receptor específico dos monócitos - o CD14 - após o que se dá aumento da síntese de mRNAs que codificam as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (Hailman *et al.*, 1994). A produção de IFN- γ pelas células "natural killer" (NK) em resposta ao LPS amplia o mecanismo de produção de TNF- α pelos macrófagos. Em situações clínicas de sepsis devidas a LPS circulante, estas monócinas vão ser responsáveis, directa ou indirectamente, por alterações na permeabilidade endotelial, com risco grave de desregulação hemodinâmica, a qual, como ficou dito atrás, pode conduzir à morte do doente.

O TNF- α é uma citocina pleiotrófica produzida por diversos tipos celulares. Foi demonstrado claramente que é o mediador mais importante da patologia associada à sepsis e ao choque séptico. A produção *de novo* de TNF- α é um fenómeno complexo já que as moléculas de TNF- α parecem ser originadas a partir de um pequeno "pool"

intracelular de mRNA que é mantido num estado não transcrito, e também de um outro mRNA recém transcrito (Beutler & Cerami, 1986). Estímulos como o LPS induzem a aceleração da transcrição génica de ambos os mRNA, quer o que se encontra já sintetizado quer o sintetizado *de novo*. O IFN- γ controla a síntese de TNF- α ao nível da tradução génica e é capaz de desbloquear o controlo da transducção nas estirpes murinas resistentes à endotoxina, como é o caso do ratinho C3H/HEJ que não sintetiza TNF- α em resposta ao LPS (Freudenberg *et al.*, 1991). O mRNA que codifica para o TNF- α atinge o seu valor máximo 90 minutos após o tratamento de monócitos com LPS e declina algumas horas depois, mesmo em presença constante de LPS (Andersson *et al.*, 1992).

A IL-1 é produzida por diversos tipos celulares, nomeadamente: monócitos/macrófagos, células NK, células endoteliais, células de Langerhans, neutrófilos, fibroblastos e células T maduras (Dinarello, 1988). Tem um efeito pirogénico endógeno e, tal como o TNF- α , a sua síntese pode ser induzida não só pelo LPS, como por toxinas bacterianas e pelo próprio processo de fagocitose (Cannon *et al.*, 1990). Por si própria, a IL-1 não apresenta grande capacidade de induzir choque mas ao actuar em sinergia com o TNF- α tem participação importante na fisiopatologia do choque séptico e na destruição dos tecidos a ele associado (Curtis *et al.*, 1990; Creasey *et al.*, 1991).

A IL-6 é produzida por células T, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e células neoplásicas. A IL-6 pode ser induzida pela IL-1, TNF- α e por factor de crescimento derivado das plaquetas. Apesar da IL-6 ser produzida pelos macrófagos na presença de LPS (Hirohashi & Morrison, 1996), dados experimentais têm sugerido que é induzida pelo TNF- α e IL-1 mais do que pela endotoxina directamente (Forge & Remick, 1990). As acções da IL-6 são múltiplas e complexas ainda não se encontrando completamente estabelecidas (Hirohashi & Morrison, 1996), no entanto dois dos seus efeitos mais importantes tem a ver com a indução da resposta da fase aguda da

inflamação e com a estimulação do crescimento de células B activadas numa fase tardia de diferenciação (Forge & Remick, 1990).

A IL-8 é um membro família de citocinas quimiotácticas de baixo peso molecular originalmente isolada de fagócitos mononucleares humanos estimulados com LPS; a IL-8 apresenta-se idêntica ao factor quimiotáctico dos neutrófilos (Hechtman *et al.*, 1991). É rapidamente induzida pelas citocinas IL-1 e TNF- α . A IL-8 induz quimiotaxia, desgranulação e explosão respiratória em leucócitos polimorfonucleares humanos em concentrações nanomolares, interagindo com um seu receptor específico localizado na membrana plasmática (Zee *et al.*, 1991).

A IL-10, ou factor de inibição de síntese de citocinas, tem capacidade de inibir nas células mononucleares a síntese de TNF- α , IL-1 e IL-6, a nível da transcrição (Mossman, 1991). A síntese de IL-10 é induzida nas células mononucleares entre as 7 e as 8 horas atingindo um pico máximo 24 horas após estímulo das células com LPS (Andersson *et al.*, 1992).

1.3. Activação de Linfócitos T

Os linfócitos T apresentam uma grande variedade de receptores capazes de responderem a sinais do meio exterior. Entre estes estão as moléculas que fazem reconhecimento antigénico e que são classicamente denominadas como receptores de células T ("T Cell Receptor" - TCR), já que a sua interacção com o antigénio é o ponto de partida para uma resposta imune específica. A activação específica do linfócito T requer não só que haja correcta apresentação do determinante antigénico ao TCR (por meio de moléculas apresentadoras de antigénio) como a co-estimulação de outros receptores de superfície da célula T. Sabe-se, portanto, que a activação específica das células T, pelo menos dois tipos de sinais tem de estar presentes, de modo que em sinergia induzam uma resposta positiva dos linfócitos (Bretscher & Cohn, 1970). Se não houverem sinais co-estimulatórios, o linfócito não responde e torna-se anérgico

(Jenkins *et al.*, 1988) ou entra em apoptose (Webb *et al.*, 1990). Nas células T um destes segundos sinais de co-estimulação que parece ser fundamental na activação celular é a interacção entre moléculas B7.1 ou B7.2 com os antígenos de superfície CD28 ou o CTLA-4 (Bluestone, 1995).

A activação de linfócitos T ou B por antígeno ou anticorpos para o receptor do antígeno induz múltiplas modificações bioquímicas nas células estimuladas. Estas alterações incluem os seguintes processos: aumento da fosforilação proteica, elevação do cálcio citosólico, activação de cinases C das proteínas, indução da expressão génica, diferenciação e, finalmente, proliferação celular. Todos estes processos são mediados por um aumento da fosforilação proteica (Germain, 1994).

Células T "Naive", de Memória e Efectoras

As células T periféricas são consideradas como pertencendo a um dos três estadios seguintes: "naive", de memória ou efectoras. Uma célula "naive" é um precursor T circulante que não encontrou o seu antígeno específico nem foi activada desde que deixou o ambiente tímico. Um linfócito de memória é definido como uma célula derivada de uma célula "naive" após ter encontrado o seu antígeno no contexto de uma célula apresentadora de antígeno (APC), mas que entrou subsequentemente em estado de repouso, estando pronta para responder de novo se vier a contactar o antígeno.

No adulto as células de memória existem em maior número do que as células "naive" e são células de vida longa, podendo persistir durante vários meses ou anos. As células de memória, individualmente, têm um "turnover" mais rápido do que o das células "naive" quando são estimuladas, o que garante a persistência da população de memória. Tanto as células "naive" como as células de memória apresentam combinações características de antígenos de superfície, o que permite a sua separação, mas não exprimem habitualmente marcadores de activação (Croft, 1994).

As células efectoras, tal como as células de memória, têm experiência anterior de contacto com o antígeno, mas encontram-se activamente a exercer funções que são específicas de células T. São definidas como células de vida curta, provenientes de

células "naive" ou de memória, que surgem alguns dias após estimulação destas pelo antígeno. Podem encontrar-se num estado de blastização (blastos que exprimem os antígenos de superfície $IL2R^+$ ou $CD69^+$) podendo requer re-estimulação para passarem a ter actividade efectora (Bradley *et al.*, 1993).

Parte das células efectoras parece corresponder a uma população terminal e que morre após re-estimulação, enquanto outras destas células sobrevivem e expandem para entrarem no "pool" de células de memória. Os linfócitos T $CD4^+$ "naive" produzem apenas IL-2 durante a estimulação inicial, enquanto que as células de memória ou efectoras podem produzir um perfil de citocinas diferente. Há evidência crescente de que os linfócitos T $CD8^+$ também apresentam um perfil de produção de citocinas que varia de acordo com o seu estado de diferenciação. O estado de diferenciação das células T correlaciona-se também com a sua dependência relativamente a sinais co-estimulatórios.

O Receptor da Célula T (TCR)

A grande maioria dos linfócitos T apresenta como receptor específico para o antígeno um heterodímero que é constituído por duas cadeias transmembranares, as cadeias α e β ; cada uma destas cadeias possui uma região variável e uma região constante. Ambas as cadeias são necessárias para o reconhecimento antígeno. A molécula CD3 está intimamente associada ao TCR e tem função modulatória de transdução de sinal envolvido na activação celular que é induzida pelo antígeno. De facto, em todas as células T imunocompetentes o receptor da célula T encontra-se ligado, ainda que de forma não covalente, em complexo com o CD3, molécula composta por 7 cadeias péptidicas ($CD3 \gamma$, $-\delta$, $-\epsilon$, ζ - ζ e ζ - ν) e que fazem a transdução do sinal de reconhecimento antígeno através do heterodímero $\alpha\beta$ para o interior da célula. As cadeias α e β são requeridas para a especificidade da resposta dos linfócitos T. A estimulação induzida por um antígeno e os fenómenos que lhe são subsequentes estão directamente associados a interacção com o complexo CD3/TCR. Anticorpos anti-CD3 induzem proliferação, produção de IL-2 e bloqueio de várias funções como, por exemplo, a de citotoxicidade (Weiss & Littman, 1994).

Activação por Via de CD2 e CD28

Estudos recentes indicam que a activação por via do CD2 pode ocorrer em células que não apresentam o complexo TCR-CD3, como os timócitos imaturos, ou mesmo células T CD3⁻, sugerindo um papel fisiológico para a activação por via do CD2 na proliferação e diferenciação de percursores de células T durante a sua ontogenia.

A activação celular T induzida por anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD28 parece estar dependente de macrófagos, contrariamente à activação por via do CD2 que parece ser independente do macrófago, já que pode ocorrer na ausência destas células. Apesar da activação por via do CD2 ou do CD28 ser independente do complexo TCR, ambas as vias de activação parecem ser fortemente reguladas pela estrutura do TCR. Modulação do TCR leva a uma inibição transitória da proliferação dependente de CD2 ou de CD28 em células T maduras, assim como em timócitos CD3⁺.

A activação de células T expressa-se por proliferação celular e produção de citocinas, requer, como ficou dito atrás, pelo menos dois sinais distintos. O primeiro sinal é dado aquando da apresentação antigénica no contexto do MHC; o TCR interage com o antígeno no contexto do MHC expresso nas células apresentadoras de antígenos. O segundo sinal, ou sinal co-estimulatório, é dado por interacção receptor-ligando, diferindo das interacções que se dão ao nível do TCR. Nos ratinhos e em humanos o CD28 foi identificado como uma molécula através da qual os sinais co-estimulatórios podem ser emitidos. A molécula CTLA4 encontra-se expressa nos linfócitos T e parece estar igualmente envolvida na activação de células T dependente da apresentação antigénica. Estudos de activação de linfócitos T feitos em presença de excesso de proteína solúvel CTLA4 demonstraram que esta inibia o efeito de sinais co-estimulatórios (June *et al.*, 1990; Bluestone, 1995). A proteína B7 (B7.1) é o ligando para o CD28 e o CTLA4, é expressa em células B activadas, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T activados e foi demonstrado que é capaz de gerar sinais de co-estimulação. O grupo de Freeman identificou a existência de B7.2, um segundo ligando

do CTLA4 que é expresso em células B murinas e identificado pelo mAb GL1, que tem funções co-estimulatórias *in vivo* e *in vitro* na activação de células T dependentes das APCs (Freeman *et al.*, 1993). O B7.1 e B7.2 são proteínas codificadas por genes que pertencem à superfamília génica das imunoglobulinas.

O CD69, Antígeno Precoce de Activação

Durante o processo de activação os linfócitos T apresentam novas glicoproteínas à sua superfície celular as quais são expressas *de novo* segundo diferentes cinéticas. Um dos primeiros antígenos de superfície celular a serem induzidos em células T activadas é o CD69 que é detectável uma hora após a ligação de anti-CD3 ao complexo TCR/CD3 (Cosulich *et al.*, 1987). Uma vez expresso, o CD69 actua como molécula co-estimuladora da activação e proliferação de linfócitos T. A expressão de CD69 pode ser também induzida à superfície de células B (Kikutani *et al.*, 1986), de linfócitos NK, de neutrófilos (Gavioli *et al.*, 1992) e de eosinófilos após activação destas células, sendo constitutivamente expresso na superfície de timócitos e plaquetas. O mAb anti-CD69 reconhece activação precoce de células B ou T após estimulação mediada, por exemplo, por ésteres de forbol (por exemplo pelo PMA) e em células T NK estimuladas com IL-2.

Diversos estudos experimentais demonstraram que o antígeno CD69 é uma das mais precoces moléculas de activação a serem sintetizadas e expressas à superfície celular. A relevância do CD69 na activação de células T advém da evidência de que este antígeno é rapidamente detectado à superfície de linfócitos T após estimulação do complexo TCR/CD3 e comporta-se como molécula responsável pelo sinal de transdução do efeito de activação celular. Não se verifica expressão de CD69 à superfície de linfócitos T em repouso; no entanto, existe um "pool" intraplasmático de CD69 em linfócitos não activados. Durante a fase mais precoce de activação o aparecimento de CD69 à superfície celular pode ser devido à translocação das moléculas citoplasmáticas para a superfície celular. Estudos realizados em vários laboratórios sugerem que a indução de CD69 está dependente do RNA mensageiro e

da síntese proteica que ocorre durante as primeiras horas de activação (Ziegler *et al.*, 1994). Bioquimicamente o CD69 apresenta-se como um homodímero fosforilado composto de duas subunidades de 32 kDa e 28 KDa ligadas por uma ponte dissulfido. A activação celular através de CD69 resulta na sua fosforilação, enquanto que o CD69 expresso nos timócitos é constitutivamente fosforilado (Hara *et al.*, 1986).

A activação de células T é induzida após combinação de sinais a nível do TCR e sinais co-estimulatórios variando em diferentes subpopulações de células T. Este fenómeno pode ser ilustrado pela observação de que se pode detectar resposta em todas as células T após um forte sinal do TCR e no entanto, esta resposta poder ser ampliada pela presença de APCs expressando moléculas co-estimulatórias. Alguns linfócitos T requerem menos co-estimulação para atingirem o pico da resposta do que outras. Assim, as células T “naive” apresentam uma resposta fraca ou nula ao mAb anti-CD3 e necessitam de níveis elevados de co-estimulação para atingir o pico máximo de proliferação e produção de citocinas, enquanto que as células T de memória respondem moderadamente e necessitam de menos co-estímulo; finalmente, as células T efectoras respondem bem ao anti-CD3 e requerem ainda menos co-estimulação (Croft, 1994).

1.4. Apoptose

Conceito de Necrose

Qualquer célula pode ser induzida a morrer através da exposição a agentes tóxicos. De uma maneira geral, as células expostas a agentes tóxicos letais morrem por necrose, uma resposta patológica que envolve aumento dramático do volume celular com rotura da membrana plasmática que conduz a lise da célula. O fenómeno da necrose não requiere a expressão *de novo* de mRNAs ou de proteínas. Vários estudos sugerem que a necrose é iniciada por lesão da membrana plasmática que leva a desequilíbrio osmótico; iões, nomeadamente divalentes, passam a entrar passivamente na célula provocando um aumento da concentração iónica intracelular. Em consequência, ocorre um influxo de moléculas de água e, portanto, um aumento do volume celular. A

subida intracelular excessiva da concentração de Ca^{2+} intracelular inibe várias vias enzimáticas, nomeadamente as associadas à produção de ATP, enquanto que estimula outras relacionadas, por exemplo, com a proteólise. A não ser que a célula consiga rapidamente reverter estas alterações, a morte celular por necrose ocorre (Schwartz & Osborne, 1993).

Como a necrose é o processo responsável pela destruição de células e de tecidos associado a diversas patologias e agressões, não está, naturalmente, envolvido na renovação celular fisiológica dos tecidos (Kerr, 1971). De facto, o processo de necrose afecta só células sãs, isto é células cuja fisiologia era normal antes da resposta ao estímulo tóxico, assim como induz, secundariamente, a libertação de componentes intracelulares que levam a resposta inflamatória de consequências lesivas para os tecidos circundantes à lesão inicial.

Morte Celular Programada

A morte celular programada ("Programmed Cell Death" - PCD) foi inicialmente descrita em insectos por Lockshin e Williams em 1964 (Lockshin & Williams, 1964). Estes autores utilizaram pela primeira vez o termo PCD para descrever o destino das células dos músculos intersegmentares dos insectos que deixam de ter qualquer tipo de função após a eclosão do casulo. A morte celular faz parte das necessidades fisiológicas da maioria dos tecidos, com algumas importantes excepções, como é o caso do tecido nervoso. A PCD é fisiológica e faz-se segundo mecanismos distintos daqueles que ocorrem por necrose. Estes processos só começaram a ser compreendidos na última década e levaram a conceitos novos como o de PCD e de apoptose. Uma diferença marcante entre os processos de PCD e da necrose é o facto da PCD requerer a expressão *de novo* de genes (Ellis *et al.*, 1991). Para os imunologistas, o conceito de PCD é visto habitualmente como englobando qualquer tipo de morte celular que é dependente da expressão *de novo* de genes (Ellis *et al.*, 1991), qualquer que seja a natureza do estímulo inductor. A PCD é resultado do aparecimento ou da perda de um sinal exterior à célula, fenómeno que desencadeia activação de um programa interno de

morte celular, envolvendo múltiplos estádios (Schwartz & Osborne, 1993). Os sinais que iniciam a PCD são quase sempre sinais fisiológicos, que por si só não são letais, isto é, são incapazes de conduzir directamente à morte celular rápida por necrose.

Morte Celular Programada e Apoptose

O termo apoptose surgiu para descrever um conjunto de características bioquímicas e morfológicas que acompanham a morte de diversos tipos celulares, quase sempre associada a PCD. A caracterização ultrastrutural da apoptose implica dilatação focal da membrana celular ("blebbing"), marginalização da heterocromatina e fragmentação do DNA nuclear. A apoptose apresenta-se assim como uma forma de PCD com características morfológicas e bioquímicas estéreotipadas e comuns a muitos tipos celulares (Squier *et al.*, 1995). No entanto, este padrão de alterações não é observado em todos os tipos de PCD. Apesar de muitos investigadores utilizarem indistintamente PCD e apoptose como sinónimos, os conceitos que envolvem são distintos dado que nem todas as formas de PCD ocorrem por apoptose, isto é, existem células onde a PCD ocorre sem que estas apresentem as alterações que estão associadas ao processo de apoptose. Pode citar-se, como exemplo disto, o que ocorre durante fenómenos de metamorfose de insectos, onde um grande número de células morre para permitir mudanças a nível estrutural e comportamental do organismo (Hengartner & Horvitz, 1994; White *et al.*, 1994). Um desses tecidos é o músculo intersegmentar da traça do tabaco, *Manduca sexta*, que morre em consequência de respostas hormonais sequenciais que precedem o desenvolvimento do insecto adulto. Como em outros exemplos de PCD, a morte deste tecido celular requer a expressão *de novo* de genes. No entanto, a ultraestrutura destas células, já sem viabilidade, não apresenta dilatação focal da membrana, marginalização da cromatina ou fragmentação de DNA. Outro exemplo, é o que se passa com neurónios de mamíferos que morrem durante o desenvolvimento embrionário e apresentam alterações nucleares semelhantes às observadas nas células do tecido muscular da *Manduca*; contudo, em determinadas condições, alguns destes mesmos neurónios podem ser induzidos a entrar

em apoptose. Os neurónios ciliados da galinha que morrem durante a neurogénese, apresentam também um tipo de PCD que não é apoptótico (Schwartz & Osborne, 1993).

Através da análise estrutural efectuada por microscopia electrónica de transmissão foi descoberto que os corpos apoptóticos (células mortas que sofreram apoptose) mantêm a membrana celular intacta que assim forma sacos, sem vida mas fechados, contendo todos os organelos celulares, assim como componentes nucleares degradados. Deste modo é evitada resposta inflamatória que ocorreria se houvesse ruptura da membrana plasmática com consequente libertação de antígenos intracelulares. Os corpos apoptóticos são ingeridos intactos por células fagocitárias que removem as células não viáveis sem que haja libertação de componentes intracelulares (Savill *et al.*, 1995).

As alterações bioquímicas mais bem definidas na apoptose ocorrem a nível nuclear onde o DNA é degradado por endonucleases que fazem a clivagem da cromatina entre os nucleossomas. Este tipo particular de degradação de DNA que é feito durante a apoptose expressa-se caracteristicamente em electroforese de gel de agarose pela detecção de bandas individuais de fragmentos de DNA que é referido como padrão em escada, isto é separação de fragmentos nucleossomais de tamanho repetitivo os, quais podem variar apenas em 180 pares de bases (Gavrieli *et al.*, 1992).

Alterações Estruturais

O processo de apoptose induz alterações a nível da superfície celular, do núcleo e do citoplasma. Após o estímulo letal, o tempo de iniciação de apoptose é variável, mas, uma vez começado, processa-se rapidamente. As células apoptóticas perdem o contacto com as células vizinhas e tendem a tornar-se esferoides. O retículo endoplasmático dilata-se e as suas cisternas mais próximas da superfície celular fundem-se com a membrana plasmática, enquanto que outros organelos citoplasmáticos podem não ser afectados. Ocorre depois uma considerável diminuição do volume celular devido à perda de água e de iões, com compactação dos organelos e aumento da

densidade celular. O núcleo condensa-se e a cromatina sofre marginalização para formar inclusões densas e granulares associadas à ainda intacta membrana nuclear a qual entra num marcado processo de dilatação focal. O núcleo separa-se em múltiplos fragmentos e a própria célula segmenta-se em diversos corpos apoptóticos rodeados pela membrana plasmática, alguns dos quais contendo fragmentos nucleares. Os corpos apoptóticos são ingeridos de seguida pelas células fagocíticas vizinhas (Wyllie, 1980).

Apoptose por Via Receptor *Fas* (APO-1 ou CD95)

O *Fas* pertence à superfamília de receptores NGF/TNF que é caracterizada por terem domínios extracelulares ricos em cisteína (Smith *et al.*, 1994). A expressão do gene *Fas*, com detecção da sua proteína na superfície celular, é induzida pelo IFN- γ , TNF- α e por activação celular. A ligação de anticorpo anti-*Fas* ao receptor da superfície celular *Fas* induz apoptose nas células sensíveis à apoptose. A proteína *Fas* é um receptor transmembranar que pode também existir na forma solúvel.

A apoptose por via do *Fas* pode ser causada por anticorpos anti-*Fas* e pelo ligando do receptor. O ligando do *Fas* apresenta similaridades com molécula transmembranar do tipo II homóloga ao TNF. O domínio citoplasmático do receptor *Fas* não apresenta sequências de consenso para actividades enzimáticas de cinases ou fosfatases e a via através da qual o sinal de apoptose é propagado não foi ainda completamente descrita (Nagata & Goldstein, 1995). A apoptose mediada pelo receptor *Fas*, requer a expressão do receptor *Fas* à superfície celular a densidade suficientes, multimerização por um ligando *Fas* solúvel ou ligado à membrana e uma célula sensível à apoptose na qual o programa anti-apoptose se encontre desactivado. Apenas se verificarem estes três requisitos as células são susceptíveis de indução de apoptose mediada pelo *Fas*; a expressão de *Fas* não é por si só, portanto, suficiente para induzir apoptose (Krammer *et al.*, 1994). A delecção periférica por apoptose de linfócitos é um mecanismo utilizado pelo organismo para assegurar a tolerância ao próprio e para

regular excessos da resposta imune; as células que conseguem escapar à selecção vão habitualmente formar a subpopulação de linfócitos de memória (Ju *et al.*, 1994).

Dados experimentais relativamente recentes fazem supor que o receptor *Fas* e o respectivo ligando estão especificamente envolvidos na apoptose desencadeada pelo TCR. A apoptose das células T pode ocorrer como resultado de uma interacção fraticida do receptor ligado à membrana da célula com o ligando ligado à membrana da célula vizinha, matando-se assim uma à outra. A apoptose induzida pelo receptor da célula T e mediada pelo *Fas* pode ocorrer de diversas formas: fraticida, morte parácrina, suicídio autócrino, ou suicídio pela interacção directa TCR-*Fas* da mesma célula T (Lynch *et al.*, 1995).

Infecção e Regulação da Morte Celular Programada de linfócitos T

A morte programada de células T induzida em resposta a vários agentes patogénicos sugere que a participação de células acessórias ao sistema imune pode representar uma etapa crítica na iniciação da apoptose de células T e indicando que, dependendo da natureza do hospedeiro e da do agente patogénico, este processo pode estar associado a respostas muito diversas.

A morte celular programada de linfócitos T é um fenómeno transitório e parece não ter efeitos duradouros em infecções virais como as provocadas pelo vírus de Epstein-Barr ou da *Varicella zooster* (Uehara *et al.*, 1992; Akbar *et al.*, 1993). Pelo contrário na infecção pelo vírus do tumor mamário murino ("mammary tumor virus"- MTV) é permanente e necessária para o ciclo celular do vírus e eficiente na prevenção de reinfecções (Golovkina *et al.*, 1992). A indução de PCD pode permitir o estabelecimento permanente de infecções não patogénicas durante a infecção por LCMV ("murine lymphocytic choriomeningitis virus) e está associada a perda da imunidade celular mediada pelos linfócitos TH1 durante a infecção por *S. mansoni*. A PCD está também associada à selecção de linfócitos CD4⁺ e perda de imunocompetência no SIDA. Nestas situações, a natureza das populações T envolvidas, a percentagem de linfócitos T afectada, a sua natureza (específica a antígeno ou policlonal), assim como a

duração do processo, podem ser fenómenos muito variáveis. Existem no entanto três factores que exercem um papel determinantes nas consequências deste processo na imunofisiologia do hospedeiro: 1) o envolvimento de percursores das células T; 2) a natureza do processo PCD; e 3) envolvimento de linfócitos de memória (Ameisen *et al.*, 1994).

A manutenção de depleção de linfócitos T antígeno-específicos ou de linfócitos T que expressam certos V β nas infecções por LCMV ou nas MTV murinas é dividida ao facto de que nestas duas situações a MCP envolve não apenas as células T periféricas maduras mas também timócitos imaturos específicos, conduzindo a uma completa e permanente forma de tolerância T (Marrack *et al.*, 1993; Zinkernagel *et al.*, 1993). As lentivirose também infectam o timo e levam, no caso de lentivirose patogénicas a uma permanente desregulação da renovação de linfócitos T através da indução não específica de PCD de timócitos. Estudos recentes indicam que outros agentes patogénicos podem também apresentar capacidade de estimular, através de mecanismos indirectos, um processo global de PCD de timócitos com completa atrofia tímica. Este fenómeno foi observado em ratinhos injectados intraperitonealmente com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas ou com LPS, havendo envolvimento, pelo menos parcial de secreção sistémica de TNF- α neste fenómeno (Wang *et al.*, 1994).

É geralmente assumido que a PCD de linfócitos T maduros à periferia ocorre quando há desequilíbrio de sinais necessários à sobrevivência da célula ou quando as células T se encontram já num estado de diferenciação terminal. Sabe-se também que subpopulações de linfócitos T desenvolveram mecanismos de citotoxicidade que envolvem a indução de PCD em células alvo (Goldstein *et al.*, 1991). Em particular, linfócitos T CD4⁺ do tipo TH1 e algumas células CD8⁺ foram recentemente identificadas como inductoras, através da sua expressão da molécula do ligando *Fas*, de PCD em células T activadas que expressam a molécula *Fas* à sua superfície (Ju *et al.*, 1994). A morte mediada pelo gene *Fas* é rápida, pode completar-se em poucos minutos e não pode ser desactivada por bloqueio de síntese de proteínas ou pela modulação de

sinais celulares (Goldstein *et al.*, 1991). A apoptose mediada por *Fas* induzida nas células T CD4⁺ pode ter efeito directo sobre linfócitos singenéticos activados, podendo assim ter um papel determinante na imunoregulação da resposta por linfócitos T (Kagi *et al.*, 1994).

1.5. Súmula dos Objectivos

Esta dissertação teve como objectivo fundamental investigar características da resposta inespecífica do sistema imunológico a estímulos produzidos no hospedeiro pela infecção. Estudei a relação entre resposta inflamatória com predomínio de neutrófilos e resistência a infecção por micobactérias, caracterizei o efeito activador *in vivo* dos linfócitos T que é produzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram-negativas, assim como procurei determinar a participação de vários possíveis mecanismos celulares na activação das células pelo LPS. De um modo sistematizado, apresento de seguida os objectivos essenciais dos estudos experimentais que realizei e estão contidos nesta dissertação:

1. Determinar se o aumento sistémico do número de granulócitos polimorfonucleares (que acompanha habitualmente as infecções por micobactérias) altera a resistência de ratinhos a infecção experimental por *Mycobacterium avium*, tanto em murganhos susceptíveis como em murganhos resistentes a este agente infeccioso.

2. Utilizar uma estirpe murina recentemente identificada como apresentando, desde o nascimento, significativa diminuição da resposta neutrofílica a estímulos flogísticos (ratinhos MRL com mutação *lpr*), para estudar se esta anomalia se traduz por diminuição significativa da resistência do hospedeiro à infecção por *M. avium*.

3. Caracterizar a cinética da marcada resposta de activação *in vivo* de linfócitos T que é observada em murganhos injectados com lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, comparando-a com a resposta de activação celular que várias subpopulações linfocitárias apresentam *in vitro* ao mesmo LPS.

4. Definir a participação de fenómenos de apoptose na morte celular que eu identifiquei como ocorrendo secundariamente em linfócitos T que eram sujeitos a activação *in vivo* por injeção dos ratinhos com LPS de bactérias Gram-negativas.

5. Testar experimentalmente o possível papel de vários mecanismos celulares e moleculares que potencialmente participem na marcada activação de linfócitos T *in vivo* induzida pelo LPS e também contribuir para esclarecer a discrepância entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* do LPS na activação celular de linfócitos T e B.

2. Estudos Experimentais

2.1. "Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria susceptible BALB/c mice"

Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of Mycobacteria-susceptible BALB/c mice

A. P. CASTRO*, A. P. ÁGUAS*† & M. T. SILVA* *Centre for Experimental Cytology, and

†Department of Anatomy of the Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

(Accepted for publication 23 February 1993)

SUMMARY

We have investigated the effect of inflammation on host resistance against infection by *Mycobacterium avium*, an atypical mycobacteria species that is responsible for life-threatening opportunistic infections in AIDS patients. Inflammation was induced in BALB/c mice by two intraperitoneal injections of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant, FIA). The BALB/c strain was chosen because it is naturally susceptible to *Myco. avium* infection. One week after the second FIA injection, the BALB/c mice were infected intravenously with 2.6×10^6 *Myco. avium* bacilli; at this time, the mice showed systemic granulocytosis because of the FIA injections. The kinetics of the murine infection was determined during 3 months by quantification of *Myco. avium* loads in the major target organs (liver and spleen) of the mycobacteria. The FIA treatment resulted in a significant decrease in the growth of *Myco. avium* in the infected BALB/c mice. This enhancement in host resistance to *Myco. avium* infection lasted for 2-3 months. In contrast with BALB/c animals, C3H mice (naturally resistant to *Myco. avium* infection) did not show an increased anti-*Myco. avium* action in association with the FIA treatment. The antimycobacterial effect of the FIA injections in BALB/c mice was compared with that produced by the injection of mycobacterial antigens (heat-killed *Myco. tuberculosis*) added to the mineral oil (i.e. Freund's complete adjuvant, FCA). The FCA treatment resulted in strong and sustained enhancements in the microbicidal capacities of BALB/c, and also of C3H mice. Data obtained with mutant athymic BALB/c mice revealed that the anti-*Myco. avium* effect of the FCA treatment was T cell-dependent. Our results indicate that: (i) non-immune inflammatory stimulation (FIA) of *Myco. avium*-susceptible hosts is able to cause a significant, albeit transient, increase in the resistance to *Myco. avium* infection; (ii) this protective effect is enhanced if heat-killed mycobacteria are added to the phlogistic agent (FCA), i.e. if a T cell-dependent response is induced; and (iii) systemic increase in the number of circulating granulocytes may help host defence against *Myco. avium* infection.

Keywords mycobacteria infection granulocytes inflammation neutrophils

INTRODUCTION

The number of pathogenic infections caused by *Mycobacterium avium* has steadily increased during the last decade, mainly because *Myco. avium* is one of the most common agents identified in the opportunistic infections that plague AIDS patients [1-5]. In addition, *Myco. avium* has also been identified as the cause of severe respiratory disorders in elderly patients showing no signs of conditions that are known to predispose to infections by atypical mycobacteria [6]. In contrast with tubercle and leprosy bacilli, no drug therapy has shown a reasonably good effectiveness in stopping the growth of *Myco. avium* in

susceptible hosts. It is therefore important to test new experimental strategies aimed at enhancing the resistance to *Myco. avium* of hosts that are susceptible to this infectious agent.

Recent reports from this and other laboratories have documented that granulocytes may participate in host defence against mycobacterial infections [7-13], namely through the transfer of their antimicrobial armoury to macrophages [9], the cells that are parasitized by the mycobacteria. This concept is consistent with the finding that the more severe infections caused by intracellular parasites in AIDS patients are associated with impaired function or decreased numbers of circulating granulocytes [14].

We decided, therefore, to investigate whether a systemic increase in the number of granulocytes induced by non-immune inflammation had any effect on the resistance of mice to *Myco.*

Correspondence: Dr Anabela P. Castro, Centre for Experimental Cytology, University of Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal.

avium infection. For that, we have triggered granulocytosis in the *Myco. avium*-susceptible BALB/c mice by intraperitoneal injection of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant, FIA) before the animals were intravenously inoculated with *Myco. avium*. We followed the murine infections for 3 months and compared the action of the FIA inflammation with that produced by injection of mineral oil containing mycobacterial antigens (Freund's complete adjuvant, FCA). The effect on *Myco. avium* infection of the FIA or FCA treatments was also studied in the *Myco. avium*-resistant C3H strain of mice. Our experiments showed that the FIA inflammation caused a significant increase in the resistance against *Myco. avium* infection in BALB/c but not in C3H mice. The antimicrobial activity induced by the FIA inflammation was less pronounced and shorter lived than that produced by the T cell-dependent response triggered by the FCA treatment.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C3H, euthymic and athymic (*nu/nu*) BALB/c mice were supplied by Harlan Olac Limited (Bicester, UK) and kept in the animal facilities of this research institute under standard housing conditions, fed commercial chow and acidified water.

Mycobacteria

Bacilli of *Myco. avium* strain ATCC 25291 (serotype 2) were grown in Middlebrook 7H9 medium with ADC supplement (Difco) and 0.04% Tween 80 (Sigma). Inocula were prepared as previously described [15] and stored frozen at -70°C before use.

Experimental groups

Seventy-two 10–12 weeks old mice of each of the two strains of euthymic BALB/c and C3H animals were divided into three experimental groups of 24 mice. The animals of Group I were twice injected intraperitoneally with 100 μl of mineral oil (FIA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, cat. no. F-5506); the two i.p. injections were performed with an interval of 1 week from each other. The mice of Group II were treated similarly to the animals of Group I, with the difference that heat-killed *Myco. tuberculosis* were added to the mineral oil (i.e. FCA, Sigma, cat. no. F-4258). The mice of Group III (controls) were treated as the animals of Groups I and II, but the i.p. injections were of 100 μl of PBS. Additional groups of mice were used to study the effect of FIA, FCA and PBS treatments on the number of leucocytes of blood and peritoneal cavities of the animals. Fifteen athymic BALB/c (*nu/nu*) mice were divided in three groups of five mice that were pretreated with PBS, FIA or FCA as described above.

Mycobacterium avium infection of BALB/c and C3H mice

One week after the second i. p. injection of adjuvants or PBS, all of the euthymic and athymic BALB/c mice and C3H mice were inoculated intravenously, through a tail vein, with 2.6×10^6 colony forming units (CFU) of *Myco. avium*. The inocula were prepared from frozen-stored *Myco. avium* aliquots that were quickly thawed at 37°C and diluted in saline with 0.04% Tween 80. The 24 euthymic mice of each of the three experimental groups and of both BALB/c and C3H strains were divided into three subpopulations of six animals that were killed at 18 h, 1, 2 and 3 months of infection. The three groups of athymic BALB/c

mice were killed 3 months after the *Myco. avium* inoculation. The number of viable *Myco. avium* bacilli was determined in homogenates of liver and spleen by serial dilution and plating onto 7H10 agar media (Difco). Because liver and spleen are the major target organs of mycobacteria inoculated by the i.v. route, indices of liver and spleen enlargement were calculated using the formula: square root of organ weight/body weight $\times 100$.

Leucocyte counts

Blood for cell counts was obtained by puncture of the orbital plexus of the mice. Heparin was added to the blood to prevent coagulation and the cells were counted in a cell counter (Sysmex CC-110) to determine the number of leucocytes. Differential leucocyte counts were performed on Wright stained blood smears. Peritoneal exudates were obtained by washing the peritoneal cavities of the mice with 3 ml of PBS. The number of collected cells was determined with a haemocytometer. The cell suspensions were spun down in a cytocentrifuge onto glass slides. The preparations were fixed with 10% formol in ethanol for 1 min and stained with Wright's stain. Light microscopic observation was done to determine the percentage of each subpopulation of leucocytes.

Statistical analysis

Statistical comparison of the numerical data was done using Student's *t*-test with a two-tailed analysis.

RESULTS

We first compared adjuvant-treated and control mice regarding the number and cell type of leucocytes present in the peripheral blood and in the peritoneal cavity of the animals at the time of the *Myco. avium* infection (i.e. 1 week after the second injection of adjuvants or PBS). This comparison is illustrated in Fig. 1. We found that the adjuvant-induced inflammations caused marked enhancement in the concentration of circulating leucocytes, and also in their numbers in the peritoneal cavities of the animals. The blood leucocytosis was, in both cases, derived mostly from marked increases in the number of granulocytes; this systemic enhancement in inflammatory cells was higher in FCA-treated mice than in FIA-injected animals. At the site where the adjuvant inflammations were induced, i.e. the peritoneal cavity, the leucocytosis was predominantly of the granulocytic type in FIA-injected mice and of the monocytic type in the FCA-treated animals (Fig. 1).

Eighteen hours after the *Myco. avium* i.v. injection, we calculated the relative loads of live mycobacteria in the liver and spleen of the mice from the different experimental groups (Fig. 2a, b). This early timing was chosen for two reasons: (i) to quantify the precise number of live bacilli in liver and spleen at the beginning of the murine infections (in order to compare these values with those obtained after 1, 2 and 3 months of infection); and (ii) to search for inflammation-associated differences in the relative sorting into liver and spleen of the i.v. injected *Myco. avium* bacilli. On the latter issue, we observed that the three groups of C3H mice (FIA- or FCA-treated and controls) showed no statistical differences between their mycobacterial organ loads. In contrast, both groups of adjuvant-treated BALB/c mice showed significantly higher ($P < 0.05$)

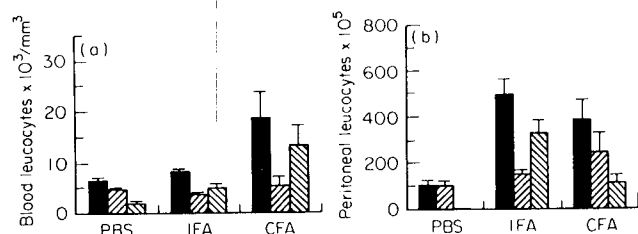


Fig. 1. Effect of intraperitoneal injections of Freund's incomplete adjuvant (FIA), i.e. mineral oil, or of Freund's complete adjuvant (FCA) i.e. FIA plus heat-killed *Mycobacterium tuberculosis*, on the number and cell type of leucocytes of blood (a) and of peritoneal cavity (b) of BALB/c mice. Controls were injected with PBS instead of adjuvants. The animals were killed 1 week after the second adjuvant injection. The FIA and FCA treatments markedly enhanced the concentration of leucocytes in the blood and their number in the peritoneal cavities of the mice. In the blood, these enhancements in leucocytes were due primarily to increase in granulocytes. The values for total leucocytes and granulocytes of FIA- and FCA-treated mice were significantly higher ($P < 0.01$) than those of controls (PBS). ■, Total; ▨, mononuclears; ▩, granulocytes.

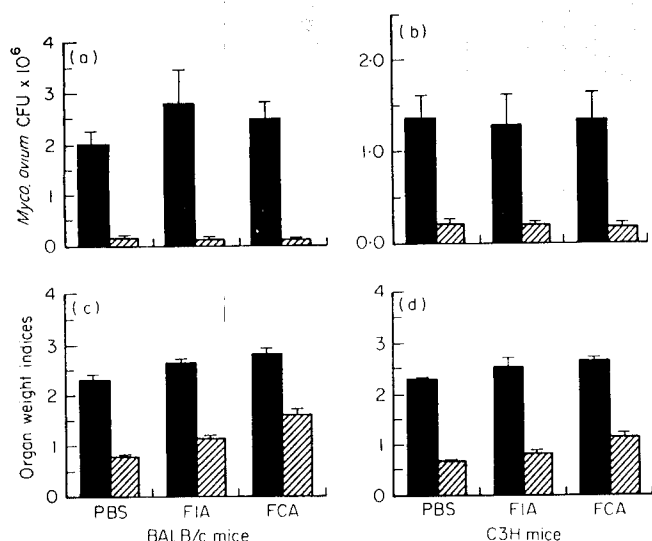


Fig. 2. Effect of Freund's incomplete adjuvant (FIA) and Freund's complete adjuvant (FCA) treatments on the *Mycobacterium avium* sorting into liver and spleen (a) and (c) and organ weight indices (c) and (d) of BALB/c and C3H mice. Controls were injected with PBS instead of adjuvant. The animals were intravenously inoculated with 2.6×10^6 CFU of *Myco. avium* 1 week after the FIA, FCA or PBS treatments. The mice were killed 18 h after the i.v. *Myco. avium* injection. The FIA and FCA pretreatments induced no changes in mycobacterial loads in livers and spleens of C3H mice, whereas the same treatments significantly increased the hepatic *Myco. avium* loads of BALB/c mice. Both adjuvant treatments significantly increased the relative weights of liver and spleen of BALB/c and C3H mice. ■, Liver; ▨, spleen.

Myco. avium loads in the liver (but not in the spleen) than the animals of the control group (Fig. 2a, b).

We found that both FIA and FCA treatments induced significant enhancement in the relative weight of both liver and spleen (measured as weight indices, i.e. square root of organ/body weight $\times 100$) of BALB/c and C3H mice determined at the time of infection (Fig. 2c, d). Of the two inflammatory

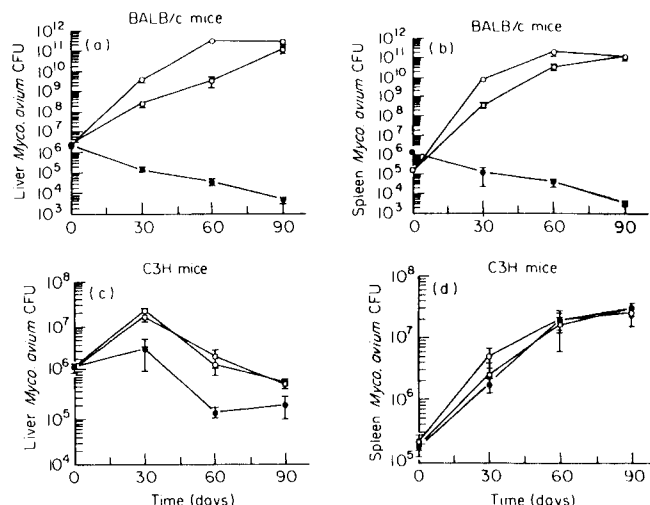


Fig. 3. Effect of Freund's incomplete adjuvant (FIA) and Freund's complete adjuvant (FCA) treatments of BALB/c and C3H mice on the kinetics of *Mycobacterium avium* loads in liver (a) and (c) and spleen (b) and (d) of the infected mice. Controls were injected with PBS instead of adjuvants. The mice were intravenously inoculated with 2.6×10^6 CFU of *Myco. avium* 1 week after the FIA, FCA or PBS treatments; the infections were studied for 3 months. In BALB/c mice, the FIA treatment induced significant reductions in mycobacterial loads that were, however, restricted to the first 2 months of infection, whereas the FCA injections had strong and sustained antimycobacterial effect that was maintained throughout the 3-months-long period of infection. In C3H mice, only the FCA treatment was able to cause significant reduction of the *Myco. avium* loading measured in the liver. ○, PBS; □, FIA; ●, FCA.

treatments, FCA induced a higher increase in organ weight. The enhancement in liver and spleen weight was higher in BALB/c than in C3H mice.

The FIA pretreatment of BALB/c mice caused a statistically significant reduction in the number of viable *Myco. avium* bacilli during the first 2 months of the infection (Fig. 3). At the second month of infection, the FIA-induced reduction in bacillar growth was higher in the liver (about 2 logs) than in the spleen (about 1 log). The antimycobacterial effect of FIA was no longer observed after 3 months of infection. The prodromic FCA injections of BALB/c mice resulted in a higher decrease in the number of viable bacilli detected in liver and spleen of the animals than that triggered by the FIA treatment. In contrast with the FIA treatment, the FCA-induced mycobactericidal action was sustained throughout the 3-months-long period of infection. When compared with controls, the FCA-treated BALB/c mice showed a massive reduction in the number of bacilli found in liver and spleen (i.e. 7 logs after 3 months of infection; see Fig. 3). The anti-*Myco. avium* effect of the FCA immunization was equally strong in liver and spleen of the BALB/c mice.

The differences in *Myco. avium* loading of spleen and liver in the three groups of mice were reflected in the weights of the two organs, and, therefore, in the liver and spleen indices (Fig. 4a, b). Thus, the FCA-treated mice, the group that showed the lowest values of *Myco. avium* loading, also presented the lowest organ indices. It must be stressed that, because of inflammation-induced enlargement of spleen and liver, the organ indices of the

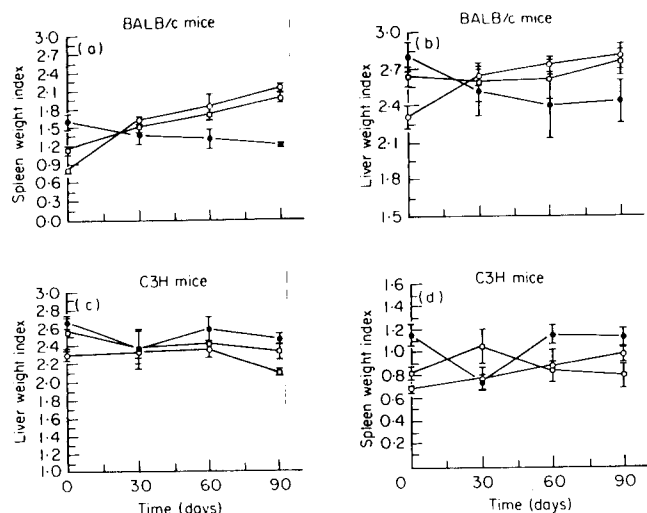


Fig. 4. Effect of Freund's incomplete adjuvant (FIA) and Freund's complete adjuvant (FCA) treatments of *Mycobacterium avium*-infected BALB/c and C3H mice on the kinetics of weight indices of liver and spleen. Controls were injected with PBS instead of adjuvant. The animals were intravenously inoculated with 2.6×10^6 CFU of *Myco. avium* 1 week after the FIA, FCA or PBS treatments and studied for the 3 months thereafter. The FCA injections caused significant reductions ($P < 0.05$) in the hepatic and splenic weight indices of BALB/c mice at 2 and 3 months of *Myco. avium* infection. In C3H mice, the variations in organ weight indices were distinct in liver and spleen: the liver values were not very different from each other, whereas in spleens the changes induced by FIA and FCA made a mirror image of each other. ○, PBS; □, FIA; ●, FCA.

three groups of mice were already different when we performed the *Myco. avium* inoculation (compare Figs 2 and 4). Interestingly, while the pre-infection treatment with FCA provoked the highest organ indices observed at the time of the *Myco. avium* inoculation, the same group of mice showed later, that is during infection, the lowest organ indices of the three experimental groups. This suggested that, from 1 month of infection on, the degree of mycobacterial loading was a more important factor for the increase in spleen and liver weight in the three groups of mice than the prodromic inflammatory stimulation that was produced by the FIA or FCA injections.

The action of the pre-infection FIA or FCA injections was also studied in a murine strain (C3H) that is naturally resistant to *Myco. avium* infection. Our goal was to compare the response of C3H mice with that of the *Myco. avium*-susceptible BALB/c mice (reported in the previous paragraphs). In the control group of *Myco. avium*-infected C3H mice we found that the bacilli showed some initial growth in the liver and spleen of the animals, followed, after the first 1–2 months of infection, by a clear bactericidal response in the liver, the major target organ of the i.v. infection (Fig. 3c, d). In contrast, *Myco. avium* was able to continue to grow in the spleen of C3H mice, an organ that captured only 10% of the total inoculum of the i.v. injected mycobacteria.

We found that the FIA treatment caused no significant changes in the resistance of C3H mice to *Myco. avium* infection. The decrease in mycobacterial loading induced by the FCA injections was also less pronounced in C3H than in BALB/c

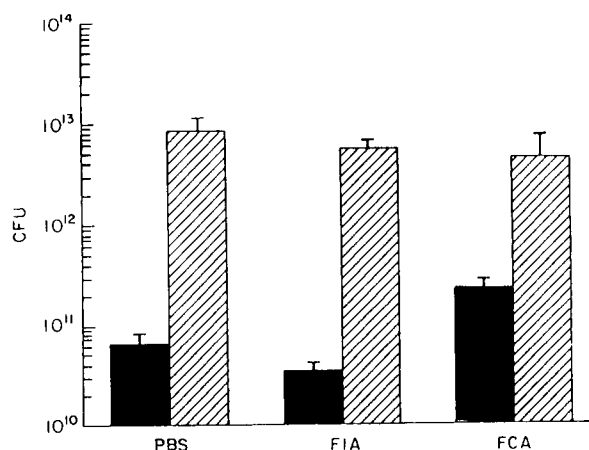


Fig. 5. Comparison of the effect of Freund's incomplete adjuvant (FIA), Freund's complete adjuvant (FCA) and PBS treatments on *Mycobacterium avium* infection of athymic BALB/c mice as represented by mycobacterial loads in liver and spleen of the animals 3 months after being inoculated with 2.6×10^6 CFU of *Myco. avium*. No statistically significant differences were observed among the three groups of BALB/c (nu/nu) mice regarding the mycobacterial loads detected in the liver (the major target organ of the infection) of the animals. The FCA pretreatment of the mice induced an increase in the *Myco. avium* loading of the spleen of the mice. ■, Spleen; ▨, liver.

mice. It should be noted that the reason for this difference will have to take into account that the innate antimycobacterial capacities of the C3H mice will not allow *Myco. avium* bacilli to grow up to the elevated numbers that are observed in the susceptible BALB/c mice; consequently, an equally effective anti-*Myco. avium* action of the FCA treatment may result in higher reduction of mycobacterial loads in BALB/c than in C3H mice.

The FCA injections of C3H mice resulted in a significant decrease in the number of *Myco. avium* bacilli counted in the liver of the animals during the whole 3-month period of infection; this antimycobacterial action of FCA immunization increased from the first to the second month of infection. The anti-*Myco. avium* action of FCA was shorter in the spleen than in the liver of the C3H mice: the only significant reduction in spleen *Myco. avium* loading caused by the FCA treatment was observed in the group of mice that were killed after 1 month of infection (Fig. 3c, d).

Adjuvant-injected C3H mice showed different variations in weight indices of liver and spleen during the *M. avium* infection (Fig. 4c, d). The relative effects of FIA and FCA treatments on the spleen weight indices were quite variable. The values for the two groups of mice were almost the mirror image of each other: FCA-treated mice showed the lowest splenic indices at 1 month of infection, and the highest at 2 and 3 months of infection, and FIA-treated mice presented the highest values at 1 month and the lowest at 2 and 3 months (Fig. 4c, d). Regarding the liver weight indices, the values for the three experimental groups were indistinguishable after 1 month of infection, and from then on (2 and 3 months of infection) the FCA-treated mice presented the highest values.

In order to investigate whether T lymphocytes participated in the expression of the strong anti-*Myco. avium* effect of adjuvant treatments that was found in the *Myco. avium*-susceptible BALB/c mice, we have studied the infection in

mutant athymic BALB/c mice. The antimicrobial consequences of FCA, FIA and PBS treatments in the T cell-deficient BALB/c mice were, thus, compared with the data obtained in euthymic congenic mice. After 3 months of infection, no significant difference in compound (liver plus spleen) mycobacterial loading was seen in athymic mice between FCA, FIA or PBS-treated animals (Fig. 5). The values of mycobacterial loading of the athymic mice were slightly higher than those of PBS-treated euthymic BALB/c animals.

The major difference between the euthymic and athymic BALB/c mice was in the effect the FCA treatment on the *Myco. avium* infection: the adjuvant treatment failed to induce any significant increase in resistance against *Myco. avium* in the T cell-deficient mice, a finding that was in contrast with the strong antimycobacterial action triggered by FCA immunization in the euthymic mice. Interestingly, the FCA treatment of athymic BALB/c animals induced a significant enhancement in *Myco. avium* loading in the spleen of the T cell-deficient mice (Fig. 5).

DISCUSSION

We report here that non-antigenic inflammation triggered by FIA in *Myco. avium*-susceptible BALB/c mice resulted in a significant enhancement in the resistance of the animals to a subsequent infection by *Myco. avium* bacilli. In contrast, the same FIA-triggered inflammation failed to increase the anti-*Myco. avium* response of C3H mice, a murine strain that is naturally resistant to *Myco. avium*. Addition of heat-killed *M. tuberculosis* to FIA (i.e. FCA) enhanced the effectiveness and duration of the antimycobacterial effect of the FIA treatment in both BALB/c and C3H mice.

Intraperitoneal injection of mice with FIA is known to cause inflammatory phenomena that include local and systemic granulocytosis (as documented here) and stimulation of phagocytes [16–18]; it does not, however, enhance cellular immunity [19]. Thus, our data on FIA-treated BALB/c mice indicate that non-specific stimulation of phagocyte function and number is by itself (i.e. in absence of an enhanced T cell response) an effective mechanism to increase the resistance against *Myco. avium* infection in naturally susceptible hosts. The inflammatory changes produced by FIA i.p. injection were found to be transient [16–19]; this may explain the also transient nature of the anti-*Myco. avium* effect of FIA in BALB/c mice.

A recent study showed that infusion of the adjuvant muramyl dipeptide (MDP, N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) in a gel delivery system (hypromellose), performed at the onset of *Myco. avium* i. v. infection of BALB/c mice, led to a significant increase in the resistance of the mice to the mycobacteria [20]. This enhanced resistance was expressed by a 2 log reduction (as compared with controls) in mycobacterial loads after 80 days of infection. MDP had also been reported to enhance the resistance of mice against *Myco. intracellulare* infection [21]. The MDP-hypromellose effect was found to be T cell-independent and associated with increased bacteriostatic activity of macrophages [20]. Interestingly, treatment of mice with MDP alone failed to induce any significant anti-*Myco. avium* change in the mice [20]. In contrast with this finding, we observed that FIA was able to trigger by itself a significant reduction in *Myco. avium* loads in BALB/c mice, an effect that lasted up to the second month of infection. This difference

between the antimycobacterial actions of MDP and FIA indicates that, of the two adjuvants, FIA may produce the stronger anti-*Myco. avium* action.

We found that i.p. treatments with FCA resulted in the acquisition of a strong and sustained mycobactericidal activity by the *Myco. avium*-susceptible BALB/c mice; this effect was present throughout the 3-month period of infection. The intensity of the FCA antimycobacterial action was expressed by a 7 log reduction in *Myco. avium* loads observed in the treated BALB/c mice. In contrast with FIA, i.p. injection of mice with FCA is known to induce strong B and T cell responses, i.e. FCA triggers an immune response, whereas FIA causes a non-immune stimulation of phagocytes [16–19]. We also found that the FCA treatment triggered higher systemic granulocytosis than the FIA injections. This is important, because several studies have shown that granulocytes may increase host defence against mycobacteria [7–12].

The two murine inbred strains used in this study were previously reported to be naturally resistant (C3H) or naturally susceptible (BALB/c mice) to *Myco. avium* infection; this innate resistance/susceptibility trait is known to be associated with the expression of the *Bcg* gene [22–26]. We found that the anti-*Myco. avium* action of FCA in BALB/c mice is T cell-dependent, since it was not observed in athymic mice of the same strain. Our data can not, however, define the relative contribution of specific and non-specific resistance to mycobacteria involved in this T cell-dependent anti-*Myco. avium* effect produced by FCA. Further studies will be necessary to address this question, namely the comparison of our data with those obtained with an intracellular bacterium unrelated to mycobacteria.

Our finding that, in comparison with FIA, the FCA treatment caused a marked increase in BALB/c resistance to *Myco. avium* indicates that a previous contact with mycobacterial antigens, even from non-living bacilli, may result in a significant enhancement in the resistance to *Myco. avium* in hosts that are susceptible to this infectious agent. Earlier reports have documented significant augmentations in host resistance against tubercle bacilli upon immunization of animals with oil-saline emulsions containing mycobacterial cell walls (CW) [27–33].

In recent years, Orme [33] has reinvestigated the nature of the increased anti-*Myco. tuberculosis* resistance induced by the CW-containing emulsions in *Bcg*⁺ mice. He found that the treatment did not result in protective immunity, since the antimycobacterial resistance could not be transferred to naive mice through the transfusion of T lymphocytes, the cells that are known to mediate protective immunity against mycobacteriosis [34–36]. He also showed that the protection produced by the CW-containing emulsions was a transient phenomenon lasting no more than a few weeks [33]. Our data can not, however, be readily compared with Orme's findings [33] because of the quite different experimental protocols that the two studies have adopted. In fact, he tested host resistance to other mycobacterial species (*Myco. tuberculosis*) and used different time courses between vaccination and challenge. In addition, Orme also chose a distinct adjuvant: an oil-in-water emulsion that is cleared faster by the animals than the oil adjuvants that we have used here.

In C3H mice killed 18 h after the *Myco. avium* inoculation we found no statistical difference of mycobacterial loads of target organs (liver and spleen) between adjuvant-treated (FIA

and FCA) and control animals. In contrast, in BALB/c mice the *Myc. avium* loads of liver and spleen were higher in the adjuvant-treated mice than in control animals. These higher mycobacterial loads may be related to augmentation of number and/or phagocytic activity of liver and spleen macrophages induced by the prodromic adjuvant inflammations, an interpretation that is derived from previous reports of increased phagocytic activity of macrophages from mice submitted to injections of phlogistic agents [37–39]. The dissimilarity between the phagocytic responses of the two murine strains suggests that their macrophages respond differently to inflammatory stimulation.

In the *Myc. avium*-resistant (*B6g*) C3H mice, the *Myc. avium* bacilli showed a moderate growth in the spleen of the animals throughout the 3 months of infection, whereas the opposite phenomenon was found in the liver of the same mice. In addition, in the spleen of C3H mice, the FCA injections had a weak anti-*Myc. avium* effect that was restricted to the group of mice killed after 1 month of infection. In contrast, the same FCA treatment caused a marked increase in antimycobacterial activity in the liver of the same animals. These differences suggest that, in C3H mice, macrophages from liver and spleen have different anti-*Myc. avium* capacities.

Because adjuvant treatment of mice caused systemic granulocytosis, it is reasonable to consider that the increase in granulocyte number may be one of the factors that participates in the enhancement of the anti-*Myc. avium* resistance caused by the prodromic adjuvant injections. This interpretation is supported by previous evidence showing that granulocytes can kill mycobacteria *in vitro* [7,8] and that they can also indirectly enhance host resistance against mycobacteria by the transfer of their antimicrobial molecules to macrophages [9].

Our findings are of particular importance because, in contrast with the currently available pharmacological therapy of *M. tuberculosis* infections, there is no reliable drug treatment of pathogenic *Myc. avium* infections. In conclusion, our study shows that non-specific stimulation of inflammatory cells is a useful strategy to increase the resistance to *Myc. avium* in hosts that are susceptible to the infection, and also that the addition of heat-killed mycobacteria to the phlogistic agents may further augment the effectiveness of host response against *Myc. avium*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Professor Ian Orme (Department of Microbiology, Colorado State University, USA) for helpful comments on the manuscript, and Dr Rui Appelberg for discussions. We thank Dr Maria Isaura Sousa for help with leucocyte counts. This investigation was supported by the JNICT (Portuguese Research Council) and the Damien Foundation (Brussels, Belgium).

REFERENCES

- Hawkins CC, Gold JWM, Wimberly E. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; **105**:184–6.
- Modilevsky T, Sattler FR, Barnes PF. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1989; **149**:2201–5.
- Contreras MA, Cheung OT, Sanders DE, Goldstein AC. Pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 1988; **137**:149–52.
- Collins FM. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1989; **2**:360–37.
- Tsang AN, Denner JC, Brennan PJ, McClatchy JK. Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:479–84.
- Prince DS, Peterson DD, Steiner RM *et al.* Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 1989; **321**:863–8.
- Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1987; **156**:985–9.
- Jones GS, Amirault HJ, Andersen BR. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a non-oxidative process. *J Infect Dis* 1990; **162**:700–4.
- Silva MT, Silva MNT, Appelberg R. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microbial Pathogenesis* 1989; **6**:369–80.
- Appelberg R, Silva MT. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1989; **78**:478–83.
- Appelberg R, Pedrosa JM, Silva MT. Host and bacterial factors control the *Mycobacterium avium*-induced chronic peritoneal granulocytosis in mice. *Clin Exp Immunol* 1991; **83**:231–6.
- Geertsma MF, Nibbering PH, Post, van Furth R. Interferon-activated human granulocytes kill ingested *Mycobacterium fortuitum* more efficiently than normal granulocytes. *Eur J Immunol* 1990; **20**:869–73.
- Castro AG, Esaguy N, Macedo PM, Aguas AP, Silva MT. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils *in vivo* and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect Immun* 1991; **59**:3009–14.
- Ellis M, Gupta S, Galant S, Hakim S, Vandeven C, Toy C, Cairo MS. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive study. *J Infect Dis* 1988; **158**:1268–76.
- Silva MT, Appelberg R, Silva MNT, Macedo PM. *In vivo* killing and degradation of *Mycobacterium avium* within mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1987; **55**:2006–16.
- Bomford R. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. *Clin Exp Immunol* 1980; **39**:426–34.
- Herbert WJ. The mode of action of mineral-oil-emulsion adjuvant on antibody production in mice. *Immunology* 1968; **14**:301–9.
- Warren H, Vogel FR, Chedil LA. Current status of immunological adjuvants. *Ann Rev Immunol* 1986; **4**:369–88.
- Woodard LF. Surface chemistry and classification of vaccine adjuvants and vehicles. *Bacterial vaccines*. New York: Alan R. Liss, 1990:281–306.
- Denis M. *In vivo* modulation of atypical mycobacterial infection: adjuvant therapy increases resistance to *Mycobacterium avium* by enhancing macrophage effector functions. *Cell Immunol* 1991; **134**:42–53.
- Edwards CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RB, Pabst MJ. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide or interferon. *J Immunol* 1986; **136**:1820–7.
- Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshaven PA, Charles C, Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1982; **297**:506–9.
- Orme IM, Stokes RW, Collins FM. Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. *Infect Immun* 1986; **54**:56–62.
- Stokes RW, Orme IM, Collins FM. Role of mononuclear phagocytes in the expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. *Infect Immun* 1986; **54**:811–8.
- Skamene E. Genetic control of susceptibility to mycobacterial infections. *Rev Infect Dis* 1989; **11**:S394–S399.

- 26 Appelberg R, Sarmiento AM. The role of macrophage activation and Bcg-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. Clin Exp Immunol 1990; **80**:324-31.
- 27 Anacker RL, Barclay WR, Brehmer W, Larson CL, Ribi E. Duration of immunity to tuberculosis in mice vaccinated intravenously with oil-treated cell walls of *Mycobacterium bovis* strain BCG. J Immunol 1967; **98**:1265-73.
- 28 Anacker RL, Barclay WR, Brehmer W, Goode G, List RH, Ribi E, Tarmina DF. Effectiveness of cell walls of *Mycobacterium bovis* BCG administered by various routes and in different adjuvants in protecting mice against airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Am Rev Resp Dis 1969; **99**:242-9.
- 29 Barclay WR, Anacker RL, Brehmer W, Ribi E. Effect of oil-treated mycobacterial cell walls on organs of mice. J Bacteriol 1967; **94**:1736-47.
- 30 Ribi E, Larson C, Wicht W, List R, Goode G. Effective nonliving vaccine against experimental tuberculosis in mice. J Bacteriol 1966; **91**:975-83.
- 31 Larson CL, Ribi E, Wicht WC, List RH, Goode G. Resistance to tuberculosis in mice immunized with BCG disrupted in oil. Nature 1963; **198**:1214-5.
- 32 Meyer TJ, Ribi E, Azuma I. Biologically active components from mycobacterial cell walls. V. Granuloma formation in mouse lungs and guinea-pig skin. Cell Immunol 1975; **16**:11-9.
- 33 Orme IM. The immune response to the cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG. Clin Exp Immunol 1988; **71**:388-93.
- 34 Orme IM, Collins FM. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. J Exp Med 1983; **158**:74-3.
- 35 Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunological memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 1988; **140**:3589-93.
- 36 Orme IM, Miller ES, Roberts AD *et al.* T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 1992; **148**:189-96.
- 37 Fauve RM, Hévin B. Influence d'une réaction inflammatoire sur la résistance des souris à l'infection par *Listeria monocytogenes* et *Salmonella thyphimurium*. CR Acad Sci (Paris) 1977; **271**:2037-40.
- 38 Michel J, Hurtel B, Lagrange PH. Incidence d'une réaction inflammatoire sur la résistance des souris envers *Plasmodium berghei*. Ann Immunol (Inst. Pasteur) 1982; **133**:97-101.
- 39 Fontan E, Fauve RM. Increased phagocytic activity in mice treated by a mouse granuloma protein. Ann Inst Pasteur (Immunol) 1986; **137D**:93-107.

2.2. "Effect of mycobacterial infection in lupus prone MRL/lpr mice: enhancement of life span of autoimmune mice, amelioration of kidney disease and transient decrease in host resistance"

EFFECT OF MYCOBACTERIAL INFECTION IN THE LUPUS-PRONE MRL/*lpr* MICE: ENHANCEMENT OF LIFE SPAN OF AUTOIMMUNE MICE, AMELIORATION OF KIDNEY DISEASE AND TRANSIENT DECREASE IN HOST RESISTANCE

ANABELA P. CASTRO¹, NAIR ESAGUY^{1,2} and ARTUR P. ÁGUAS^{1,3*}

¹Center for Experimental Cytology & Departments of Microbiology² and Anatomy³ of the Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, 4000 Porto, Portugal.

(Received January 25, 1993; in final form July 27, 1993)

We have used the MRL/*lpr* murine model of spontaneous lupus to investigate three questions in infection immunity: (1) does mycobacterial infection have any effect on the mortality of the autoimmunity-prone *lpr* mice?; (2) does the infection modify the progression of kidney disease of *lpr* lupus?; and (3) does the *lpr* gene change the resistance of mice to mycobacteria? Experimental infections were induced by intraperitoneal inoculation of 10⁷ viable bacilli of *Mycobacterium avium* in 3 months old MRL/*lpr* mice and also in congenic MRL/+ mice (lacking the *lpr* gene). MRL mice were sacrificed 1, 2.5 and 4 months after the *M. avium* injection. We found that infection caused lowering of urine protein concentration in *lpr* mice as compared with age-matched *lpr* controls. Mycobacteriosis also induced a marked decrease in the mortality of *lpr* animals, e.g. 85% of infected *lpr* mice reached the age of 7 months whereas only 10% of control *lpr* mice reached the same age. MRL/*lpr* mice showed, after 1 and 2.5 months of infection, higher mycobacterial loads than the congenic non-*lpr* MRL mice; after 4 months of infection, however, differences in *M. avium* loads between the two groups of MRL mice became not statistically significant. We conclude that: (1) mycobacterial infection increases the life span of *lpr* mice; (2) the infection slows down the progression of kidney disease in the lupus-prone *lpr* animals; (3) the autoimmunity gene *lpr* is associated with a transient decrease in host resistance to mycobacteria.

KEY WORDS: Autoimmunity, Infection, Systemic Lupus Erythematosus, *Mycobacterium avium*, Glomerulonephritis, Intracellular Parasites.

INTRODUCTION

Current concepts on the role of infection in autoimmune disease include the following: (1) infection is an etiologic factor in some autoimmune disorders, namely because of molecular mimicry between microbial and host antigens¹⁻⁷ (2) autoimmune patients show enhanced susceptibility to infection⁸⁻¹⁰, and (3) infection in autoimmune patients is often associated with aggravation of their autoaggressive disorder¹¹⁻¹³. Some of these prevailing views are at variance with recent data coming from experimental studies. For instance, prevention or amelioration of autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice can be

obtained by infecting the animals with mycobacteria (BCG bacilli)¹⁴⁻¹⁷.

In a recent study, we have used NZB/W mice to investigate the natural history of mycobacterial infection in lupus-prone mice, as well as to evaluate the effect of infection on their kidney disease¹⁸. We found that NZB/W mice were naturally resistant to mycobacteria and that host response to infection accelerated lupus nephritis leading to an early death of the animals. We have now investigated whether the same mycobacterial infection had similar consequences in a different murine model of lupus, the mutant MRL/*lpr* mice that show abnormalities in immune physiology that are different from those of NZB/W mice¹⁹⁻²². In contrast with our observations on infected NZB/W mice, we found that *lpr* mice benefitted from the mycobacterial infection since it caused a striking amelioration of kidney disease and marked decrease in mortality of *lpr* animals. We also observed that,

Correspondence: Dr. Anabela P. Castro, Center for Experimental Cytology, University of Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal. Fax: 351-2-699157. Phone: 351-2-699154.

during the first months of infection, MRL/*lpr* mice were significantly less resistant to mycobacteria than the congenic non-autoimmune strain (MRL/+) that lacks the *lpr* gene.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) and MRL/Mp-+/+ (MRL/+) mice were supplied by Harlan Olac Ltd (Bicester, United Kingdom) and kept in the animal facilities of this research institute under standard housing conditions. They were fed commercial chow and acidified water.

Mycobacteria

Bacilli of the *Mycobacterium avium* strain ATCC 25291 (serotype 2) were grown in Middlebrook 7H9 medium with ADC Supplement (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and 0.04% Tween 80 (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA). *M. avium* is an atypical mycobacterial species that causes life-threatening infections in AIDS patients and in elderly individuals²³⁻²⁵. The strain of *M. avium* used here has been adopted before in numerous experimental studies, performed in this and other laboratories, on the natural resistance/susceptibility of mice to mycobacteria; this is because the *M. avium* strain allows, by quantitative kinetics of liver or spleen bacterial loading, a complete separation of all inbred murine strains into animals that are either naturally resistant or susceptible to mycobacteria. Inocula of the *M. avium* bacilli were prepared as previously described²⁶ and stored frozen at -70°C before use.

Murine Infections

Twelve weeks old mice of the two congenic strains of MRL mice (MRL/*lpr* and MRL/+) were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 3×10^7 colony forming units (CFU) of *M. avium*. The inocula were prepared from frozen-stored *M. avium* aliquots that were quickly thawed at 37°C and diluted in saline with 0.04% Tween 80. Each group of MRL/*lpr* and of MRL/+ mice was made up of 5-8 mice. The animal groups were sacrificed at 1, 2.5 and 4 months of infection. The number of viable *M. avium* bacilli was determined in homogenates of liver, spleen and in peritoneal exudates by serial dilution and plating onto 7H10 agar media (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Indices of spleen and liver weight were calculated using the formula: square root of organ weight/body weight $\times 100$. Because MRL/*lpr* mice show a 50% spontaneous mortality by the 5th month of age^{21,22} we

increased from 5 to 8 the number of animals in the *lpr* groups that were to be sacrificed at 2.5 and 4 months of infection (that is at 5.5 and 7 months of age). Additional groups of 8 untreated MRL/*lpr* mice were left untreated in order to compare their values of proteinuria and organ weight indices with those of age-matched *M. avium*-infected MRL/*lpr* animals. Other three groups of age-matched *lpr* mice were divided into infected and control animals in order to evaluate changes in the mortality of *lpr* mice induced by the mycobacterial infection.

Concentration of Protein in Urine

Commercial test strips (Combur-Test, Boehringer, Mannheim, Germany) were employed to determine the protein concentration in urine of the mice. Protein concentration in urine was calculated according to the recommendations of the manufacturer.

Statistical Analysis

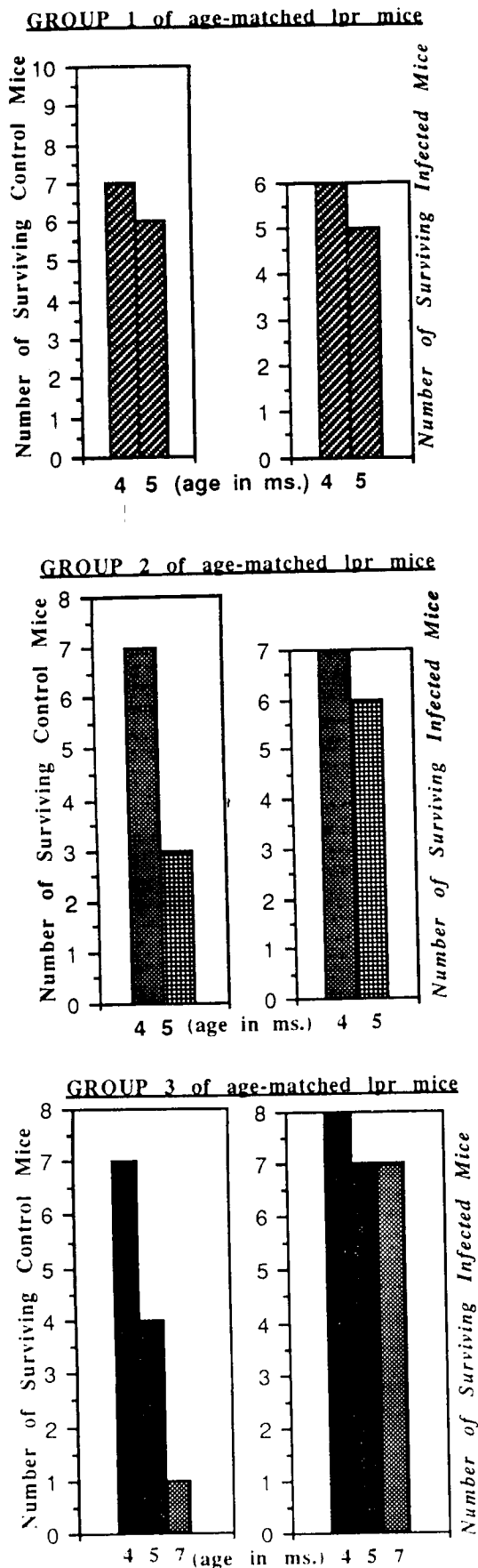
Statistical comparison of the numerical data was performed using the Student's *t* test.

RESULTS

Our experiments were designed to investigate the effect of mycobacterial infection on the progression of the lupus disease in MRL/*lpr* mice, on the mortality of the mice, and to define changes in host natural susceptibility/resistance associated with the *lpr* autoimmunity gene. The animals were inoculated at 3 months of age with 10^7 viable bacilli of *M. avium* by the intraperitoneal route. The lupus kidney disease, the mortality of the mice, and the infection were followed for 4 months.

Mortality and Proteinuria of Infected and Control Lupus-Prone MRL/*lpr* Mice

We found that *M. avium* infection was associated with a longer life span of *lpr* mice, as it was revealed by comparing the survival of age-matched infected and non-infected *lpr* mice. For this we used 3 different groups of age-matched *lpr* mice. The mortality of the animals in each of these 3 groups is depicted in Fig. 1. Data from the 3 groups was compounded in a single graph shown in Fig. 2 where we compare the percentage of infected and non-infected *lpr* mice that reached the age of 4, 5.5 and 7 months. Differences in mortality between infected and non-infected *lpr* mice was already present after 1 month of infection, that is 4 months of age, and they increased in older mice so that



at 7 months of age (that is after 4 months of infection) most of the infected *lpr* mice were alive, whereas most of the *lpr* controls were dead.

Protein concentration in the urine of infected and control *lpr* mice was used to compare the severity of the autoimmune kidney disease in the two groups of lupus-prone animals. The infected *lpr* mice showed significantly lower values of urine protein than the age-matched non-infected controls after 1 and 2.5 months of infection (Fig. 3). After 4 months of infection (that is 7 months of age), most of the non-infected *lpr* mice were already dead, thus making it difficult to compare proteinuria values with the infected *lpr* mice.

Mycobacterial Loads in MRL/lpr MRL/+ Mice

After 2.5 months of infection, we found that the *M. avium* loads in liver, spleen and peritoneal cavity of *lpr* mice were significantly higher ($p < 0.01$) than those in the organs of the infected congenic MRL/+ mice (Fig. 4). A more than 1 log difference in organ loads was observed between the MRL/*lpr* and the MRL/+ mice at this timing of infection. At 1 month of infection, significantly different ($p < 0.01$) *M. avium* loads were observed between the MRL/*lpr* and MRL/+ mice in the spleens and peritoneal cavities, but not in livers of the animals. At 4 months of infection, no statistically significant difference was found in liver and spleen *M. avium* loads between the two groups of MRL mice.

The number of *M. avium* bacilli detected in the peritoneal cavity of MRL/*lpr* mice was always higher than that found in the congenic MRL/+ mice (Fig. 4).

Because intraperitoneal *M. avium* inoculation of mice is likely to induce enlargement of the spleen in the infected mice, we have compared the spleen weight indexes (SWI) of infected *lpr* mice with those of age-matched *lpr* controls. We found that the SWI of infected and non-infected *lpr* mice were not statistically different (Fig. 5). Since progressive enlargement of the spleen is a feature of *lpr* mice, this may indicate that the enlargement of the spleen that is usually triggered by the mycobacterial infection was counter-balanced, in *lpr* mice, by the beneficial effect of infection in slowing down the progress of splenome

Figure 1. Comparison of survival between mycobacteria-infected and non-infected *lpr* mice. Three groups of age-matched *lpr* mice are shown in separate. The infected *lpr* mice received an intraperitoneal injection of 3×10^7 viable bacilli of *M. avium*. Control (non-infected) mice are depicted on the left half of the figure and infected mice on the right side. In all of the three groups of *lpr* mice, the infection resulted in an increased number of mice reaching the 4th, 5th and 7th month of age (that is 1, 2 and 4 months of infection). The compounded data of this figure was used to make up the graph in figure 2.

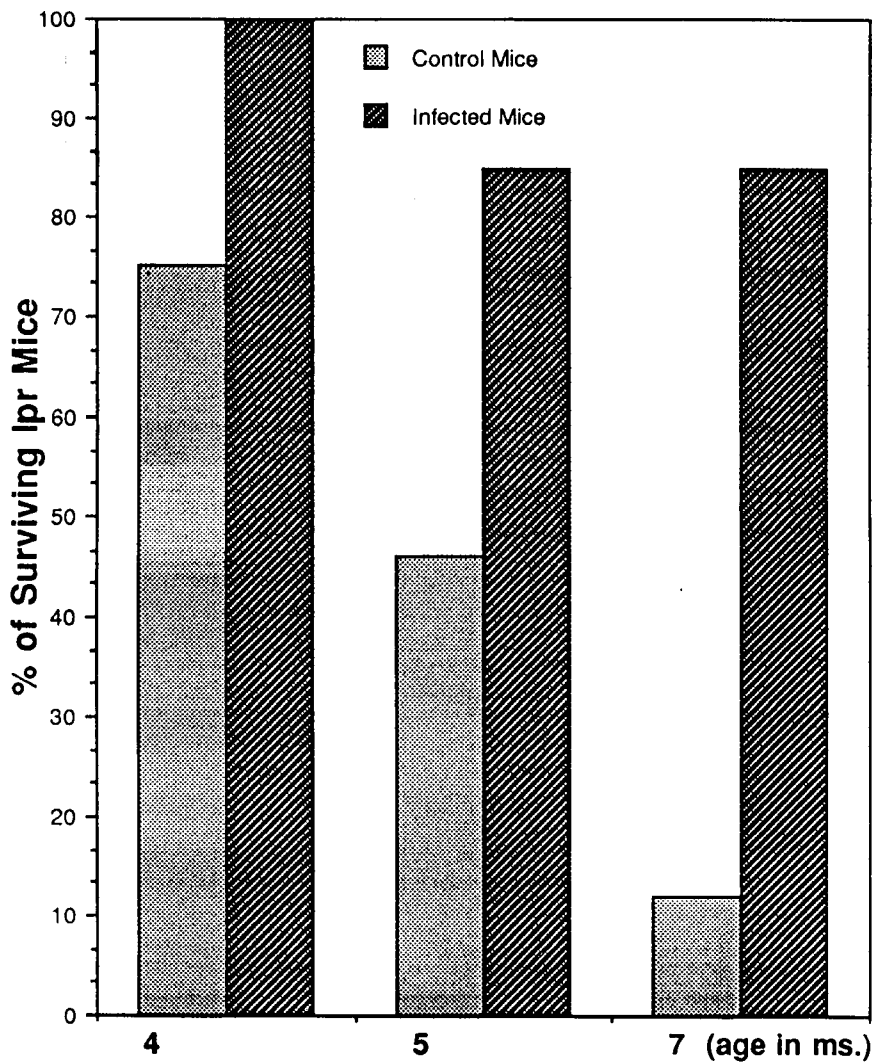


Figure 2. Comparison of survival of mycobacteria-infected and non-infected *lpr* mice as expressed by the percentage of surviving mice observed after 1, 2 and 4 months of infection (that is at the 4th, 5th and 7th month of age). The infected *lpr* mice received an intraperitoneal injection of 3×10^7 viable bacilli of *M. avium*. The mycobacterial infection induced a clear increase in the average life span of *lpr* mice.

galy. As expected the infected, non-autoimmune MRL/+ animals showed significantly lower ($p < 0.01$) SWI values than those of infected MRL/*lpr* mice. Comparison of the values of liver weight indices (LWI) in the 3 groups of mice followed the same pattern of SWI values: the *M. avium* infection did not produce significant changes in LWI in *lpr* mice and LWI of infected MRL/+ were lower than those of infected MRL/*lpr* mice (Fig. 5).

DISCUSSION

We studied here the effect of mycobacterial infection in lupus-prone MRL/*lpr* mice and we report that the autoimmunity gene *lpr* is associated with a transient

decrease in resistance to mycobacteria, and also that mycobacteriosis is beneficial for *lpr* mice since it decreases their mortality and ameliorates their kidney disease.

Decreased Resistance to Mycobacteria Associated with the lpr Gene

After 1 and 2.5 months of *M. avium* inoculation, infected MRL/*lpr* mice had a statistically significant enhancement in *M. avium* loading in liver and spleen when compared with infected congenic MRL/+ mice which lack the *lpr* gene. This *lpr*-associated decrease in resistance to mycobacteria may have a parallel in the reported decreased resistance to infection de-

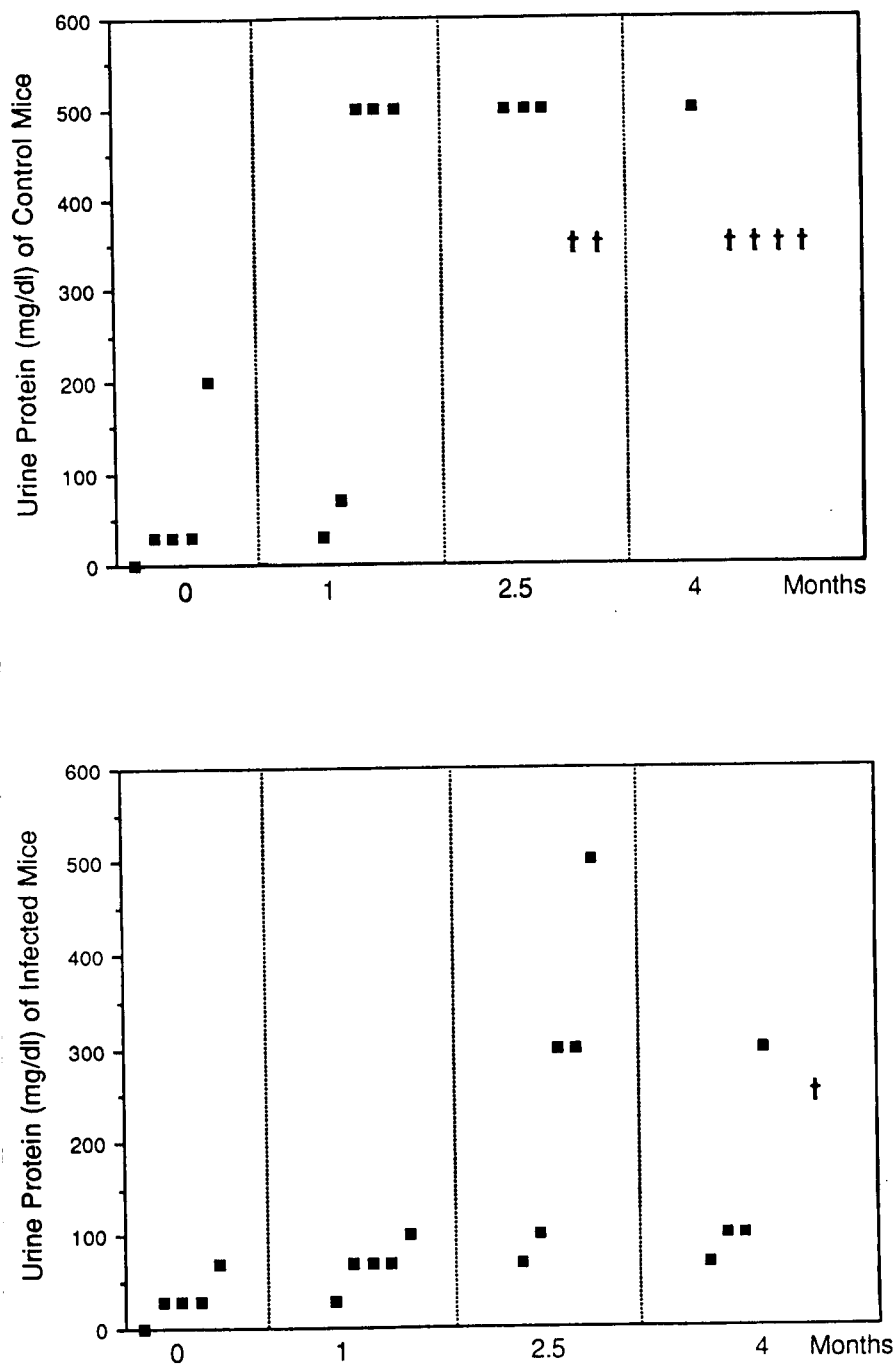


Figure 3. Representative example of comparative kinetics of the variation in protein concentration in urine of age-matched *M. avium*-infected (top) and non-infected (bottom) MRL/*lpr* mice. The infected *lpr* mice received an intraperitoneal injection of 3×10^7 viable bacilli of *M. avium*. The data are represented as values of protein concentration in individual mice from each group of infected animals (5 animals in each group). The *M. avium*-inoculated mice showed lower values of proteinuria than non-infected control mice. At 2.5 and 4 months of infection (5.5 and 7 months of age), the values of urine protein concentration represented in the figure are restricted to the surviving animals; mice that had died are represented by crosses (†).

picted by lupus patients⁸⁻¹⁰. The decreased resistance to mycobacteria of *lpr* mice was, however, a transient phenomenon that was restricted to the first months of infection. Clearly, it did not change the outcome of

host response to the infectious agent since analysis of the kinetics of mycobacterial loads revealed that both MRL/*lpr* and MRL/+ mice end up to be naturally resistant to *M. avium* infection. In fact, both groups of

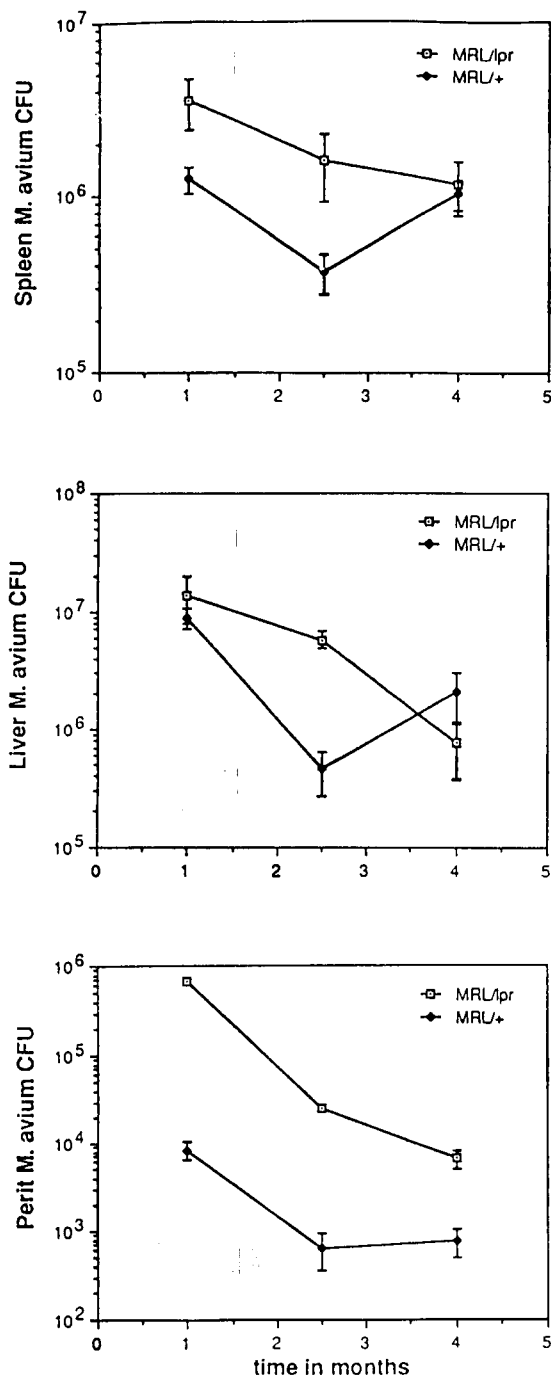


Figure 4. Comparative kinetics of *M. avium* infection in MRL/lpr and MRL/+ mice as represented by the variations of microbial loads in target organs (spleen, liver) and site of infection (peritoneal cavity) of the animals. The mycobacterial loads were determined 1, 2.5 and 4 months after the intraperitoneal injection of the animals with 3×10^7 viable bacilli of *M. avium*. The spleen mycobacterial loads (top in the figure) at 1 and 2.5 months of infection were significantly higher ($p < 0.01$) in MRL/lpr mice than in MRL/+ animals. At 2.5 months of infection, the two groups of mice also showed different mycobacterial loading of the liver (middle in the figure). Bacillary loads of the peritoneal cavity (bottom in the figure) were always higher in MRL/lpr mice than in MRL/+ animals.

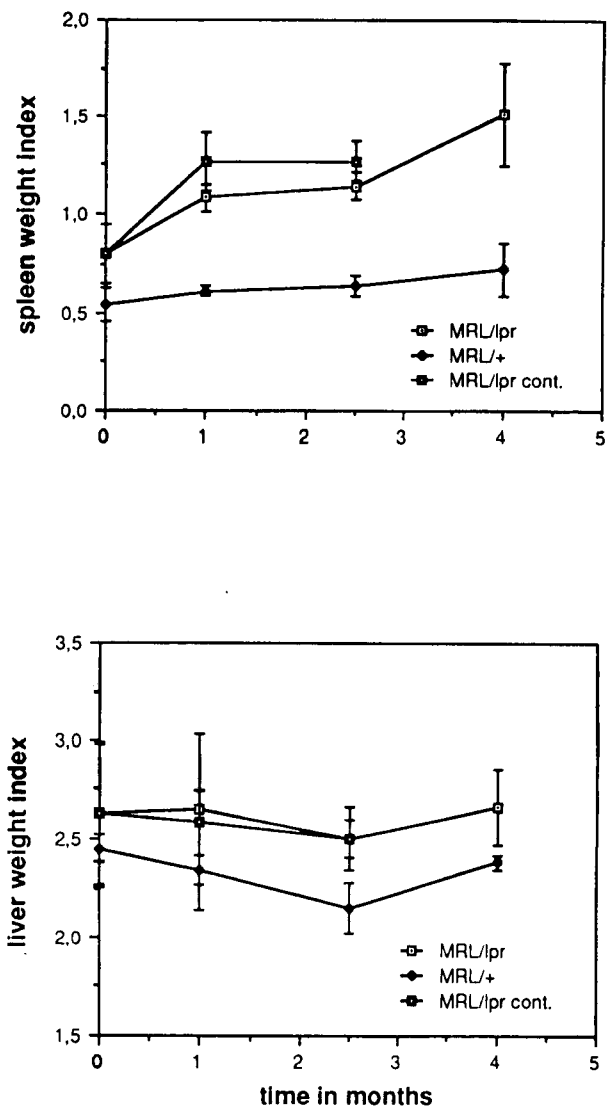


Figure 5. Comparative kinetics of indices of organ/body weight of spleen (top) and of liver (bottom) of *M. avium*-infected MRL/lpr, MRL/+ mice, and also of age-matched, non-infected MRL/lpr animals. The mice were infected by the intraperitoneal injection of 3×10^7 viable bacilli of *M. avium*. The indices were obtained using the formula: square root of organ (spleen or liver) weight/body weight $\times 100$. In lpr mice the infection did not produce significant changes in the weight indices of spleen and liver of the animals.

MRL mice showed a significant decrease in the number of viable bacilli between 2.5 and 4 months of infection, a feature that is characteristic of inbred mouse strains that are naturally resistant to mycobacteriosis²⁷⁻³⁰. Natural resistance of inbred mice to mycobacteria, and to other intracellular parasites, depends on the expression of the *Bcg* gene which is located in the chromosome 1 of the mouse²⁷⁻³⁰. *Bcg* is present in at least one of the background strains

(C3H) of MRL mice²¹ which together with *Bcg* being a dominant gene, may explain the natural resistance to *M. avium* shown by MRL mice.

It is well established that the expression of the *lpr* gene results in proliferation of CD4⁺CD8⁻ T cells, of immature B cells, and in the production of large amounts of autoantibodies^{20,22,31,32}. The expression of the *lpr* gene is also associated with several functional impairments of macrophages and neutrophils^{22,33}. All of these abnormalities may participate in the transient decrease in host resistance against *M. avium* that we found in mice bearing the *lpr* gene. In fact, enhancement in autoantibodies may decrease host resistance to *M. avium*^{34,35}, the macrophage is the major effector cell in mycobacterial infections, and the neutrophil also has an accessory antimycobacterial role in the host response³⁶⁻⁴⁰.

Amelioration of Autoimmune Disease by Mycobacterial Infection

Our finding of mycobacteria-induced amelioration of *lpr* lupus kidney disease goes against the concept that infection in lupus individuals is associated with acceleration of glomerulonephritis^{8,13}. Our report is the second example of a beneficial effect of mycobacterial infection on a spontaneous autoimmune disease: several authors have demonstrated that injection of mycobacteria can prevent or ameliorate diabetes in nonobese (NOD) mice¹⁴⁻¹⁷.

Treatments other than inoculation of mycobacteria were shown before to also slow down the progression of glomerulonephritis in *lpr* mice, e.g. the injection of heparin⁴¹, of a streptococcal preparation⁴², and of a bacterial superantigen⁴³. On contrary, acceleration of kidney disease was seen in *lpr* mice after stimulation of the mouse B cells by lipopolysaccharide⁴⁴.

Several of the known mycobacteria-induced immunomodulatory actions may contribute to the mitigation of renal disease in *lpr* mice. Previous evidence coming from work done with *lpr* mice suggests that increase in IL2 production may be among these phenomena: for instance, Ramos-Gutierrez and coworkers⁴⁵ have shown that the *lpr* autoimmune disease can be treated by infecting the animals with a recombinant vaccinia virus expressing the IL2 gene. Interestingly, a deficient production of IL2 has also been reported in human lupus⁴⁶.

In contrast with the herein data on *lpr* mice, in another murine model of spontaneous lupus (NZB/W mice) we have found that mycobacterial infection resulted in acceleration of kidney disease¹⁸, which was consistent with work by Engleman *et al.* also on mycobacteria-infected NZB/W mice⁴⁷. Thus, mycobacterial infection has opposite effects in NZB/W and *lpr* mice with regards to the progression of their lupus

kidney disease. The difference may reflect the heterogeneous nature of the immunological abnormalities that lead to the expression of lupus. To further compare the immunomodulatory actions of mycobacteria on *lpr* mice with that on NZB/W mice appears, therefore, to be a promising experimental strategy to better understand the pathophysiology of lupus.

Acknowledgements

We are grateful to Professor Manuel T. Silva for support and critical evaluation of the manuscript, to Professor Rui Appelberg and Professor Mário Arala-Chaves for discussions. Dr. Aguas also thanks the travel support of the European Concerted Action on Immunopathogenesis and Immunotherapy of Chronic Arthritis (project leader Dr. René R. P. de Vries). This work was supported by grants from the J.N.I.C.T. (Portuguese Research Council) and by the Damien Foundation (Brussels, Belgium).

References

1. Cohen IR, Young DB. The immune system's view of invading microorganisms, autoimmunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1990; 12: 105-110
2. Cohen IR. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 567-589
3. Aguas AP, Esaguy N, Sunkel CE, Silva MT. Crossreactivity and sequence homology between the 65-kDa mycobacterial heat shock protein and human lactoferrin, transferrin and DR_β subsets of MHC class II molecules. *Infect Immun* 1990; 58: 1461-1470
4. Aguas AP, Esaguy N, van Embden JDA, Silva MT. Autoimmune disease and leprosy: role of molecular mimicry between host and *Mycobacterium leprae* proteins. *Health Coop Papers (Italy)* 1991; 12: 87-93
5. Esaguy N, Aguas AP, van Embden JDA, Silva MT. Mycobacteria and autoimmune disease: direct evidence of cross-reactivity between human lactoferrin and the 65-kilodalton protein of tubercle and leprosy bacilli. *Infect Immun* 1991; 59: 1117-1125
6. Shoenfeld Y, Isenberg DA. Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol Today* 1988; 9: 178-182
7. Van Eden W. Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 1991; 121: 5-34.
8. Pisetsky DS. Systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 917-923.
9. Schwartz BD. Infectious agents, immunity and rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 457-465
10. Vaughan JH. Infection and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 708-717.
11. Banks KL, Jacobs CA, Michaels FH, Cheevers WP. Lentivirus infection augments concurrent antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1046-1053.
12. Corman LC. Acute arthritis occurring in association with subcutaneous dirofilaria tenuis infection. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1431-1434
13. Ehrenstein M, Isenberg D. Autoimmunity associated with infection: leprosy, acute rheumatic fever and Lyme disease. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 930-935
14. Yagi H, Matsumoto M, Kishimoto Y, Makino S, Harada M. Possible mechanism of the preventive effect of BCG against diabetes mellitus in NOD mouse. *Cell Immunol* 1991; 138: 130-141.

15. Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1576-1580
16. Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker MO, Cohen IR. Vaccination against autoimmune mouse diabetes using a T cell epitope of human hsp65. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3088-3091.
17. Ulaeto D, Lacy PE, Kipnis DM, Kanagawa O, Unanue E. T-cell dormant state in the autoimmune process of nonobese diabetic mice treated with complete Freund's adjuvant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3927-3931
18. Esaguy N, Macedo PM, Castro AP, Águas AP. Acquisition of autoimmunity genes by New Zealand mice is associated with natural resistance to infection by mycobacteria. *J Autoimmun* 1992; **5**: 641-651
19. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine systemic lupus erythematosus. *Immunol Rev* 1981; **55**: 179-216
20. Perkins DL, Glaser RM, Mahon CA, Michaelson J, Marshakrothstein A. Evidence for an intrinsic B-cell defect in *lpr-lpr* mice apparent in neonatal chimeras. *J Immunol* 1990; **145**: 549-555
21. Schuurs AHWM, Verheul HAM, Wick G. Spontaneous autoimmune models. In: *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1989; 449-485.
22. Cohen PL, Eisenberg RA. *lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 243-269
23. Modilevsky T, Sattler FR, Barnes PF. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1989; **149**: 2201-2205
24. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, Figueroa WG, Fish JE. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *New Engl J Med* 1989; **321**: 863-868
25. Collins FM. *Mycobacterium avium*-complex infections and immunodeficiency. In: M. Bendinelli S, and H. Friedman H, Eds. *Mycobacterium tuberculosis: Interactions with the Immune System*. New York: Plenum Press, 1988; 389-412
26. Silva MT, Macedo PM. The interpretation of the ultrastructure of *Mycobacterium* cells in transmission electron microscopy of ultrathin sections. *Int J Lepr* 1983; **51**: 225-234
27. Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol* 1981; **127**: 2417-2421
28. Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PAL, St. Charles C, Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1982; **297**: 506-509
29. Orme IM, Stokes RW, Collins FM. Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. *Infect Immun* 1986; **54**: 56-63
30. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 1993; **73**: 469-485
31. Klinman DM, Eisenberg RA, Steinberg AD. Development of the autoimmune B cell repertoire in MRL-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1990; **144**: 506-511
32. Watanabe FR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorders in mice explained by defects in *Fas* antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; **356**: 314-317
33. Gersham H, Ray CJ, O'Sullivan A. Defective neutrophil function in the autoimmune mouse strain MRL-*lpr*. *J Immunol* 1991; **146**: 3911-3921
34. Denis M. Growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 391-395
35. Ferreira P, Soares R, Arala-Chaves MP. Susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* is paradoxically correlated with increased synthesis of specific antibacterial antibodies. *Internat Immunol* 1991; **3**: 445-452
36. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. Capacity of human monocytes to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1987; **156**: 985-989
37. Silva MT, Silva MNT, Appelberg R. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defense against mycobacterial infections. *Microb pathogenesis* 1989; **6**: 369-380
38. Appelberg R, Silva MT. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1989; **78**: 478-483
39. Appelberg R, Pedrosa JM, Silva MT. Host and bacterial factors control of the *Mycobacterium avium*-induced chronic peritoneal granulocytosis in mice. *Clin Exp Immunol* 1991; **83**: 231-236
40. Castro AP, Águas AP, Silva MT. Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 1993; **92**: 466-472
41. Naparstek Y, Benyehuda A, Madaio MP, Bartana R, Schuger L, Pizov G, Neeman Z, Cohen IR. Binding of anti-DNA antibodies and inhibition of glomerulonephritis in MRL-*lpr/lpr* mice by heparin. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 1554-1559
42. Mihara M, Ohsugi Y. Autoimmune kidney disease in MRL/*Mp-lpr* mice inhibited by OK-432, a streptococcal preparation. *Clin Exp Immunol* 1989; **78**: 102-107
43. Kim C, Siminovich KA, Ochi A. Reduction of lupus nephritis in MRL-*lpr* mice by a bacterial superantigen treatment. *J Exp Med* 1991; **174**: 1431-1437
44. Cavallo T, Granholm NA. Lipopolysaccharide from gram-negative bacteria enhances polyclonal B-cell activation and exacerbates nephritis in MRL-*lpr* mice. *Clin Exp Immunol* 1990; **82**: 515-521
45. Ramos-Gutierrez J, Andrew JL, Revilla Y, Viñuela, Martinez-A C. Recovery from autoimmunity of MRL-*lpr* mice after infection with an interleukin-2/vaccinia recombinant virus. *Nature* 1990; **346**: 271-274
46. Hishikawa T, Tokano Y, Sekigawa I, Ando S, Takasaki Y, Hashimoto H, Hirose S, Okumura K, Abe M, Shirai T. HLA-DP + T-cells and deficient interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; **55**: 285-296
47. Engleman EG, Sonnenfeld G, Dauphinee M, Greenspan JS, Talal N, McDevitt HO, Merigan TC. Treatment of NZB/NZW F1 hybrid mice with *Mycobacterium bovis* strain BCG or type II interferon preparations accelerates autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1981; **24**: 1396-1402

2.3. "Secondary participation of CD4 and CD8 T cells following endotoxin administration to mice"

**Secondary participation of CD4 and CD8 T cells following
endotoxin administration to mice**

by

Ana Castro[°], A. Bandeira^{*}, A. Águas^{°#}, A. Coutinho^{*}, & A. Nóbrega^{*}

Unité d'Immunobiologie, CNRS URA 1961, Institut Pasteur, Paris^{*}, &

[°]Centro de Citologia Experimental & [#]Departamento de Anatomia do
Instituto Abel Salazar da Universidade do Porto^{°#}

Summary

We have studied activation of splenic and lymph node B and T lymphocytes, as monitored by the expression of the early activation marker CD69, after intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS). Injection of C57BL/6 mice with LPS caused a dose-dependent increase in the numbers of B cells expressing CD69, that could reach nearly 100% of the whole compartment. Most T cells also expressed this early activation marker, with similar kinetics as B lymphocytes, maximal values being detected at 20 hours after LPS administration. CD69 expression on T lymphocytes is associated with cellular activation, since these cells undergo blast transformation. In contrast, *in vitro* activation of total spleen cells with LPS only induces CD69 expression on B lymphocytes.

Injection of LPS in the endotoxin-resistant strain B10.Sc.Cr had no effect in CD69 expression by either B or T cells. Transfer of either LPS-activated B blasts, serum or peritoneal exudate from LPS-treated C57BL/6 mice had no effect in CD69 expression by T cells of B10.Sc.Cr recipients.

Our results demonstrate the massive engagement of T lymphocytes after LPS administration into mice. This result may contribute further understanding to endotoxin shock, to the adjuvant and immunosuppressive effects of LPS in T cell-dependent antibody responses, as well as to the association of autoimmunity with some bacterial infections.

1. Introduction

Lipopolysaccharide (LPS) is the key microbial molecule involved in the high mortality of gram-negative bacterial sepsis. A recent estimate shows that, in the United States alone, Gram-negative bacteria cause 30,000 - 100,000 deaths per year, out of a total of 400,000 cases of bacteremia (1, 2). Endotoxin in circulation, prompts release of TNF α , IL-8, IL-1, IL-6 and IL-10 from monocytes, that directly or indirectly affect endothelial permeability, with risk for severe damage and profound hemodynamic perturbations that may terminate in death. It is the sum of all these agents and mechanisms that determines the outcome of a patient with invasive Gram-negative infection (3)

LPS is also well known as a polyclonal B cell mitogen, activating resting B lymphocytes to proliferation and high-rate immunoglobulin secretion. B cell responses *in vivo*, however, take a few days to develop, in contrast with the rapid acute-phase responses to endotoxin described above. A variety of studies have also demonstrated the inability of LPS to stimulate T cells *in vivo* and *in vitro* (4, 5) More precisely, no evidence has been obtained for lymphocyte-derived cytokine production after LPS treatment (5).

In the course of experiments investigating LPS-induced B cell responses *in vivo*, we analyzed the numbers and activation stage of T cell populations in these animals, as measured by the expression of several early activation markers, such as CD69 (6). CD69 is a disulfide-linked protein dimer that is present in the cytoplasm of resting T cells, but is rapidly translocated to the cell surface, through a PKC-dependent pathway that is independent of RNA and protein synthesis, upon activation by a broad range of stimuli (7, 8). At the cell surface, CD69 bears a large cytoplasmic domain in association with a GTP-binding protein (8), and it has been involved in processes of "co-stimulation" (9).

We report here that LPS treatment of normal, but not endotoxin-resistant, mouse strains results in CD69 expression by a large fraction of all T cells, within 20 hours. As shown in experiments using endotoxin-resistant mutant mice (10, 11) these T cell responses are not due to direct activation by LPS, but secondary to other endotoxin-activated processes in a responder environment. LPS-dependent CD69 expression by T cells seems to be functionally significant, as many of these undergo blast transformation in the following days, and remain refractory to re-induction by new LPS treatments for one week or longer. Such a "contagious" T cell participation in endotoxemia may be of biological significance in the late phases of these responses.

2. Materials and Methods

2.1. Mice. C57BL/6 (B6), B6.Thy-1.1 (B6.Ba) and B10.Sc.CR (B10) were bred and kept in our animal facilities at the Pasteur Institute, and used at 8-10 weeks of age.

2.2. LPS treatment *in vivo*. LPS from *Salmonella typhimurium* (Difco Laboratories, USA) was administered intraperitoneally (i.p.) in PBS. Unless otherwise stated, the dose used was 100 µg/mouse.

2.3. Cell suspensions. Single cell suspensions were prepared from lymph nodes and spleen, and the number of viable cells counted using trypan blue exclusion, in three independent samples from each preparation.

2.4. Cell Cultures. Cultures were set up at 2×10^6 cells/ml/well in 24 well plates, in RPMI 1640 medium (Bioproducts, MD, USA) supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin (all from Flow Labs, Irvine, UK), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M) (Merck, Darmstadt, Germany), gentomycin (Unilabo, France), 10 mM HEPES buffer pH 7.3 (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 10% of a selected batch of foetal calf serum (FCS; Mannheim, Boehringer, Germany). In some experiments, FCS concentrations were varied from 0.1% to 10%, as indicated. Cultures were stimulated by addition of 25 µg/ml of LPS or 5 µg/ml of an anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) (12).

2.5. Monoclonal antibodies. The following purified mAbs were used: anti- μ^b , MB-86 (13); anti-CD4, GK1.5 (14); anti-CD8, 53-6.72 (15); anti-Thy-1.1 (15); anti-CD69 (PharMingen) and anti-IL2R (16). The mAbs were conjugated with biotin, fluorescein-isothiocyanate (FITC), or phyco-erythrin (PE) for FACS analysis.

2.6. Flow cytometry. Flow cytometry was performed as described (17). Briefly, the cells were stained with FITC- or PE-labelled mAbs together with biotin-coupled mAbs, and revealed by either streptavidin-PE or streptavidin-cychrome from Becton-Dickinson (Grenoble, France). Dead cells were

excluded from analysis using a combination of forward light scatter and propidium iodide gating (17). All analyses were performed on a FACScan analyzer (Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA. USA) interfaced to a Hewlett-Packard computer, using the FACScan and the LYSIS II research software programs.

2.6. Purification B cell populations. B cell enriched populations were prepared from spleen and lymph nodes by depletion of T cells by treatment with anti-Thy-1 antibody and complement, as described (18).

2.7. Cell transfers. B cell enriched populations of B6 mice stimulated *in vivo* with LPS or saline for 20h were transfer into B10 mice, 10^7 cells were injected in the retroorbital vein of B10 mice and B6 (control). The mice were sacrificed 20 and 48h after cell transfer.

3. Results

3.1. LPS administration *in vivo* results in CD69 expression by both B and T lymphocytes.

In the course of experiments following B cell activation in LPS treated mice, we have noted that expression of activation markers was altered in splenic T lymphocytes. We have quantified the representation and total numbers of spleen and lymph node B and T cells that expressed the early activation marker CD69, 20 hours after the i.p. injection of 100 µg LPS in B6 mice. As expected, the majority of B cells (85-90% of total) in LPS-treated mice are CD69⁺ (Fig.1 A), the numbers of activated B cells increasing over 10 fold upon LPS treatment (Table 1). Surprisingly, both CD4 and CD8 T cell populations also show a striking increase in the representation CD69⁺ lymphocytes in LPS injected mice (Table 1). More than 70% of CD4⁺ and CD8⁺ T cells are brightly stained with anti-CD69 antibodies after treatment (Fig. 1 B and 1 C), as compared with 3-15% CD69⁺ T cells observed in control, untreated mice. Interestingly, CD69 expression in untreated control mice was variable and regularly higher in lymph nodes than in the spleen. These observations on T cell CD69 expression in response to LPS treatment were verified in a large number of experiments, although the exact representation of CD69⁺ cells in each lymphocyte sub-population was somewhat variable (see all Tables and Figures below). Other mouse strains (e.g., BALB/c) were also found to respond in comparable manners.

3.2. LPS-dependent CD69 expression by T cells is followed by extensive blast transformation.

T lymphocyte expression of CD69 following LPS treatment, suggested activation of a large fraction of this cellular compartment. We have sought to confirm this very surprising finding by other parameters of cell activation that, along a normal process, follow in time the expression of CD69. We

chose to analyse T cell blast transformation in the 3 days following LPS treatment, by quantitating cell sizes (by light scatter parameters) among CD4 and CD8-positive T cells.

As depicted in Fig. 2, forward light scatter (FSC) analysis of the CD4⁺ (gated) lymphocyte populations show that an increasing proportion of splenic T cells undergo blast transformation after LPS treatment. By day 3 after endotoxin injection, the whole CD4 population in spleen is now distributed by FSC as a single gaussian of large cells. In contrast, the majority of CD4 T cells in untreated mice occur in a sharp peak of small-sized cells. Similar findings were obtained with gated CD8 T cells, and as expected, with B cells, demonstrating blast transformation of most lymphocytes in LPS-treated mice.

We conclude that LPS treatment *in vivo* activates nearly all B cells, as recently demonstrated *in vitro* (19, 20), and in contrast with previous observations on LPS activation of only a subset of B cells (28,29). Furthermore, LPS administration surprisingly results in the activation of a large proportion of all CD4 and CD8 T cells as well.

3.3. Expression of CD69 by B and T lymphocytes following LPS treatment is dose-dependent and transient.

To evaluate the dose-dependence of the LPS-triggered increase in CD69 expression by B and T cells, we have studied the effect of i.p. injection of 5 µg, 20 µg, 50 µg and 100 µg of LPS in C57BL/6 mice. As shown in Fig. 3, mice injected with 100 µg of LPS show the highest representation of CD69⁺ lymphocytes, that account for nearly 100% of the B and CD8 T cell populations, and for 85% of CD4⁺ T cells. Injection of lower doses of LPS resulted in a decreased representation of CD69⁺ cells among B, CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes. Interestingly, doses of LPS that represent as little as 1% of the LD50 (5 µg versus 500 µg, for the LPS preparation used here), result in

CD69 expression by more than half of all T cells. LPS-induced expression of CD69 *in vivo* is thus a dose-dependent phenomenon that follows the same profile for B and T cells.

As described, CD69 expression is early and transient after lymphocyte activation (7). We have analysed CD69 expression on B, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes at different time points (20, 48 and 72 hours) after treatment of C57BL/6 mice with 100 µg of LPS. As can be seen in Fig. 4, LPS had a transient effect on CD69 expression. Thus, maximal induction is observed early after treatment (from 10 to 20 hours), followed by a rapid decline in the number of positive cells. By 72 hours after treatment, the frequency of CD69⁺ lymphocytes is only slightly higher than that scored in unmanipulated mice (Fig. 4). Other experiments have confirmed that by day 5 after LPS injection, CD69 expression by splenic and lymph node lymphocytes has returned to control levels. We conclude that the kinetics of CD69 expression by T cells following LPS administration is not different from that reported for T cells responding to mitogens (7).

3.4. In LPS-non-responder mice, T cells fail to express CD69 after LPS treatment.

The expression of an early activation marker by T cells after *in vivo* LPS treatment is very surprising, since there has been no previous indication of LPS effects on T lymphocytes (4). A trivial explanation could be that T cell responses were due to "superantigens" or T cell-directed mitogens, contaminating our LPS preparations. This could readily be tested by injecting LPS-non-responder mice. This experiment would also allow us to ascertain whether or not T cell activation in LPS-treated mice is related to the biological activities of endotoxin on other cell types, such as B cells and macrophages (21, 22). Thus, if LPS effects on T cells were independent of

endotoxin activation of other cell types, they would likely follow distinct genetic controls.

Mice of the endotoxin-resistant strain B10.Sc.Cr (10, 11), were treated with 100 μ g of LPS, and 20 hours later their spleen cells analysed for CD69 expression by T and B cells. As shown in Table 2, while in control LPS-responder B6 animals expression of CD69 by B, CD4 and CD8 T cells is markedly increased by LPS treatment, there is no alteration in the frequency of CD69⁺ cells in the spleens of B10.SC.Cr mice after LPS administration. This excludes that T cell responses in normal mouse strains treated with LPS are brought about by contaminants. Furthermore, the results indicate that T cell activation by LPS treatment *in vivo* is a component of the whole set of endotoxin activities that are controlled by a single locus on chromosome 4 of the mouse (10, 11)

3.5. LPS stimulation of *in vitro* total spleen cell cultures is not sufficient for T cell expression of CD69.

The analysis of the mechanisms leading to LPS-dependent T cell expression of CD69 would be greatly facilitated if the same phenomenon could be reproduced *in vitro*. We have, therefore, analysed CD69 expression by B, CD4 and CD8 T cells in total spleen cell cultures stimulated by LPS or, as a control, with anti-CD3 antibodies. As can be seen in Fig. 5, LPS activation rapidly leads to expression of CD69 by essentially all B cells in culture (Pannel C). In contrast to the *in vivo* data, however, stimulation with LPS fails to induce expression of CD69 in either CD4 (Pannel A) or CD8 (Pannel B) T cell populations. T cells could be readily activated to expression of CD69 by incubation with anti-CD3 antibodies. Interestingly, anti-CD3 antibodies also induce CD69 expression by most B cells, possibly as a result of T cell-dependent B cell activation, that is know to occur in these conditions (36).

3.6. Failure of adoptively transferred LPS-activated spleen or peritoneal cells to induce CD69 expression by T lymphocytes.

Having established that CD69 expression by T cells is secondary to LPS activation of a responder environment, we have attempted to identify the LPS-triggered cells or mechanisms leading to T lymphocyte activation. In a first experiment, we have studied CD69 expression in LPS-nonresponder recipients of T cell-depleted spleen cells from responder mice that has been injected with LPS 20 hours previously. As controls, similar cell transfers were carried out into LPS-responder animals. While the transferred populations are mostly composed of activated B cells (nearly 100% of CD69⁺ cells among IgM⁺ lymphocytes), they also include LPS-activated macrophages and other nonlymphoid cells present in spleen. This protocol could also allow us to distinguish the effects of LPS-activated cells from those of cell-associated LPS.

As shown in Table 3, however, the presence of LPS-activated spleen cells at a relatively high frequency in the recipient's spleen (see the representation of B cells in the different groups), results in no induction of CD69 expression in T cells of non-responder recipients. When the recipients are LPS-responder animals, there is an increase in CD69 expression by both T and B cells, that is likely to result from the injection of cell-associated LPS.

In other experiments, we have also analysed the effects of transferring peritoneal exudate cells or fluid from LPS-treated mice, with equally negative results in the induction of CD69 expression by the recipients T cells. Finally, intravenous injection of serum (1 ml/recipient) from LPS treated animals (20 hours previously) into non-responder mice, again fails to result in T cell expression of CD69 (data not shown).

Although the numbers of transferred cells may be limiting in these experiments, the results suggest that LPS-activated spleen non-T cells alone

are not capable to induce expression of CD69 by T cells, indicating that other factors may be involved in the T cell responses.

4. Discussion

The present studies describe a striking, massive T cell activation *in vivo* following LPS administration. T cell activation was monitored by the expression of the early activation marker CD69. Several studies have shown that CD69 is very rapidly expressed on T cell surfaces upon stimulation through the TCR/CD3 complex (23). Furthermore, CD69 seems to participate in signal transduction (24, 25), by association with a GTP-binding protein (8), and antibody cross-linking of CD69 enhances T cell proliferation in the presence of phorbol ester (6). In addition to being expressed by activated T lymphocytes, CD69 is constitutively expressed on CD3^{bright} thymocytes and platelets (26, 27) and it is inducible on NK cells, B cells and neutrophils (28, 29). In the present experiments, we could ascertain that most B and T cells undergo blast transformation (increase in cell size) in the few days following CD69 expression. These observations are thus in agreement with previous studies, correlating CD69 expression with full T and B cell activation (30, 31). Using an LPS-nonresponder strain, we could also confirm the relationship of CD69 expression and lymphocyte activation, since we could not find CD69 expression on either B or T lymphocytes after LPS treatment of these animals.

The major finding here is that LPS administration to C57BL/6 mice induces more than 80-90% of splenic and lymph node T lymphocytes to express CD69 at 20 hours, and transform into blast cells within the next 2-3 days. These numbers compare to less than 10% CD69⁺ and/or lymphocyte blasts in control unmanipulated mice. Ongoing experiments investigate whether or not LPS-dependent T cell activation also induces the expression of effector functions or in any other way, modulates the functional potential of the responding cells.

Two questions are now being investigated, concerning the mechanisms bringing about T cell activation in LPS treated mice. The results obtained

with endotoxin-resistant mice and cells thereof show that T cell responses are secondary to LPS-activated processes in a responder *in vivo* environment, and do not seem to require direct interactions of T cells with endotoxin. It could be hypothesized that T cell activation follows LPS-induced hyper-expression of relevant molecules (Class II MHC, surface immunoglobulins, adhesion molecules, co-stimulatory ligands) on other cells (B lymphocytes, macrophages), towards which T cells display, in normal conditions, interaction avidities that are below stimulatory thresholds. In this case, however, we would expect some degree of specificity in T cell responses, in contrast with the panclonal activation scored here. Alternatively, it may be that LPS treatment of responder mice activates nonspecific processes and mediators that, in turn, activate T cells in a complete non-specific manner. The concentrations of all proteins produced in the acute-phase response to endotoxin, namely, C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein rise very rapidly after treatment (32). In addition, studies in Gram-negative bacteriemia have demonstrated a rapid increase in circulating TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-10 (4), that could participate in T cell activation. The fact that total spleen cell cultures stimulated with LPS did not support CD69 expression on T lymphocytes, however, may be taken as an indication for the participation of mediators other than the cytokines produced *in vitro*. Thus, several studies have shown that in LPS stimulated cultures, monokine production is initiated at 30 minutes with TNF α and IL-8, followed by IL-1, IL-6 and IL-10 (4). If monokines alone were responsible for T cell activation, therefore, this could be expected to take place *in vitro* as well. On the other hand, recent studies with human peripheral blood T cells have reported the induction of CD69 expression upon culture with a mixture of interleukins, consisting of TNF α , IL-2 and IL-6. In these experiments, however, several days were

necessary for CD69 activation and the two phenomena may well be unrelated.

Another important follow-up of the present experiments concern the putative functional alterations undergone by T cells that secondarily engage in LPS-responses. It will be necessary to establish the range of their subsequent potential to display effector functions upon conventional activation, including the patterns of interleukin gene expression. Thus, it is well established that "primed" T cells often show characteristic patterns of lymphokine production that are different from those produced by "Th0" cells. Moreover, it will be interesting to evaluate whether the LPS-dependent activation reported here has consequences for T cell life-spans, homing and other biological characteristics. Thus, it has been reported that polyclonal, superantigenic T cell activation following administration of bacterial exotoxins results in subsequent apoptotic death of a majority of the activated cells (33).

The present observations may bear on the mechanisms of endotoxin-induced shock, and it will be important to compare endotoxin susceptibility in normal and T cell-deficient mutant mice (), that certainly provide better models than "nude" animals which contain a variety of mucosal-associated T cells (34). Moreover, the secondary activation of T cells described here may be relevant to the mechanisms of the adjuvant effects of LPS in T cell-dependent antibody production (35), as well as in the immunosuppression that is established a few days after LPS treatment. At large, this phenomenon, if extended to other B cell/monocyte activators of microbial origin, may be invoked to explain the massive polyclonal B and T cell responses accompanying most infections (36, 37, 38).

5. References

1. Wolff, S. M. 1991. Monoclonal antibodies and the treatment of Gram-negative bacteremia and shock. *N. Eng. J. Med.* 324:486.
2. Stone, R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failure (News report). *Science* 264:365.
3. Bone, R. C. 1991. A critical evaluation of new agents for the treatment for the treatment of sepsis. *JAMA* 266:1686.
4. Andersson, J., S. Nagy, L. Bjork, J. Abrams, S. Holm and U. Andersson. 1992. Bacterial toxin-induced cytokine production at the single-cell level. *Immunol. Rev.* 127:69.
5. Freundenberg, M. A., S. Kumazawa, S. Medling, J. Langhorne and C. Galanos. 1991. Gamma-interferon production in endotoxin-responder and non-responder mice during infection. *Infect. Immun.* 59:3484.
6. Cosulich, M. E., A. Rubartelli, A. Risso, F. Cozzolino and A. Bargellesi. 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4205.
7. Trevillyan, J. M., Y. L. Lu, D. Atluru, C. A. Phillips and J. M. Bjorndahl. 1990. Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J. Immunol.* 145:3223.
8. Risso, A., D. Smilovitch, M. C. Capra, I. Baldissarro, Y. G. A. Bargallesi and M. E. Cosulish. 1991. CD69 in resting and activated lymphocytes. Its association with GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol.* 146:4105.
9. Sanchez-Mateos, P. and F. Sanchez-Madrid. 1991. Structure-function relationship and immunochemical mapping of a external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur. J. Immunol.* 21:2317.

10. Coutinho, A., T. Meo and T. Watanabe. 1977. Independent segregation of two functional markers expressed in the same B-cell subset in the mouse: the Mls determinants and LPS receptors. *Scand. J. Immunol.* 6:1005.
11. Coutinho, A., L. Forni, F. Melchers and T. Watanabe. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* 7:325.
12. Leo, O., M. Foo, D. H. Sachs, L. E. Samelson and J. A. Bluestone. 1987. Identification of a monoclonal antibody specific for murine T3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1374.
13. Nishikawa, S. I., Y. Sasaki, T. Kina, T. Amagai and Y. Katsura. 1986. A monoclonal antibody against Igh6-4 determinant. *Immunogenetics* 23:137.
14. Dialynas, D., Z. Quan, K. Wall, A. Pierres, J. Quintans, M. Loken, M. Pierres and F. Fitch. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK-1.5: similarity of L3T4 to the human Leu 3/T4 molecule and the possible involvement of L3T4 in class II MHC antigen reactivity. *J. Immunol.* 131:2445.
15. Ledbetter, J. A. and L. A. Herzenberg. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47:63.
16. Malek, T. R., R. J. Robb and E. M. Shevach. 1983. Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukine 2 receptor-ligand complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5694.
17. Bandeira, A., T. Mota-Santos, S. Itohara, S. Degermann, C. Heusser, S. Tonegawa and A. Coutinho. 1990. Localization of γ/δ T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J. Exp. Med.* 172:239.

18. Grandien, A., A. Coutinho and J. Andersson. 1993. Development of B cells secreting endogenous or transgene-encoded immunoglobulins in H-chain transgenic mice. *Scand. J. Immunol.* 38:142.
19. Cumano, A., K. Dorshkind, S. Gillis and C. J. Paige. 1993. *Eur. J. Immunol.* 23:1561.
20. Grandien, A., Y. Modigliani, A. Coutinho and J. Andersson. 1993. Suppression of B cell differentiation by ligation of membrane-bound IgM. *Europ. J. Immunol.* 23:1561.
21. Coutinho, A., E. Gronowicz and G. Möller. 1975. Mechanism of B-cell activation and paralysis by thymus-independent antigens. Additive effects between NNP-LPS and LPS in the specific response to the hapten. *Scand. J. Immunol.* 4:89.
22. Doe, W. F., S. T. Yang, D. C. Morisson, S. J. Betz and P. M. Henson. 1978. Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. II. Evidence for differentiation signals delivered by lipid A of lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 148:577.
23. Testi, R., J. H. Phillips and L. L. Lanier. 1989. Leu23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular (Ca^{++}) and stimulation of protein kinase C. *J. Immunol.* 142:1854.
24. Cebrian, M., E. Yagüe, M. Rincón, M. López-Botet, M. O. de Landázuri and F. Sánchez-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168:1621.
25. Testi, R., J. H. Phillips and L. L. Lanier. 1989. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J. Immunol.* 143:1123.
26. Bjorndahl, J. M., S. Nakamura, S. Hara, L. K. L. Jung and S. M. Fu. 1988. The 28-kDa/32-kDa activation antigen EA 1. Further characterization and signal requirements for its expression. *J. Immunol.* 141:4094.

27. Testi, R., F. Pulcinelli, L. Frati, P. P. Gazzaniga and A. Santoni. 1990. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J. Exp. Med.* 172:701.
28. Borrego, F., J. Peña and R. Solana. 1993. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and tyrosine kinases. *J. Eur. Immunol.* 23:1039.
29. Gavioli, R., A. Risso, D. Smilovich, I. Baldissarro, M. C. Capra, A. Bargallesi and M. E. Cosulich. 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell. Immunol.* 142:186.
30. Testi, R., D. D'Ambrosio, R. De Maria and A. Santoni. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today* 15:479.
31. Ziegler, S. F., F. Ramsdell and M. R. Alderson. 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells.* 12:456.
32. Steel, D. M. and A. S. Whitehead. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* 15:81.
33. Damle, N. K., G. Leytze, K. Klussman and J. A. Ledbetter. 1993. Activation with superantigens induces programmed death in antigen-primed CD4⁺ class II⁺ major histocompatibility complex T lymphocytes via a CD11a/CD18-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 23:1513.
34. Kenai, H., G. Matsuzaki, T. Nakamura, Y. Yoshikai and K. Nomoto. 1993. Thymus-derived cytokine(s) including interleukin-7 induce increase of T cell receptor α/β ⁺ CD4⁻CD8⁻ T cells which are extrathymically differentiated in athymic nude mice. *Eur. J. Immunol.* 23:1818.
35. Johnson, A. J., V. Gaines and M. Laudy. 1956. Studies of O antigen of *Salmonella thyfosa*. V. Enhancement of the antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 103:225.

36. Izui, S., R. Kobayakawa, M. J. Zrid, J. Louis and P. H. Lambert. 1977. Mechanisms for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice. II. Correlation between anti-DNA antibodies induction and polyclonal antibody formation by various B-lymphocyte activators. *J. Immunol* 119: 2157.

37. Coutelier, J.-P., J. T. M. Van Der Logt, F. W. A. Heessen, G. Warnier and J. Van Snick. 1987. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.* 165:64.

38. Minoprio, P., Y. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa and A. Coutinho. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol.Rev.* 112:187.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

Expression of CD69 on splenic B and T lymphocytes after *in vivo* administration of LPS.

FACS analysis were performed 20h after injection and CD69 expression was studied in IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. One representative experiment out of 20 is shown. See Table 1, for statistics.

Figure 2.

B and T cell blastization after *in vivo* LPS administration.

Forward scatter histograms of spleen cells of control and LPS-injected mice are represented for "gated" populations of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes undergo blast transformation at the indicated time points after LPS treatment. The data are representative of 3 independent experiments.

Figure 3.

CD69 expression after *in vivo* administration of LPS is a dose-dependent phenomena.

Different doses of LPS, as indicated in the Fig. were injected in C57BL/mice and spleen cells were analysed by cytofluorimetry for CD69 expression among IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes.

Figure 4.

Expression of CD69 *in vivo* is a by B and T cell lymphocytes is transient

in vivo kinetics of CD69 expression was studied in C57BL/6 mice after LPS treatment. Spleen cells were analyzed by cytofluorimetry for CD69 expression among IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, at different points after LPS injection as indicated in the Fig.

Figure 5.

Kinetics of *in vitro* CD69 expression

Spleen cells were analysed for expression of CD4, CD8 IgM and CD69 expression either *ex vivo* or after *in vitro* culture for 20 and 48 hours. The Figure shows % of CD69 positive lymphocytes out of CD4⁺ (A), % of CD69 positive lymphocytes out of CD8⁺ (B), and % of CD69 positive lymphocytes out of IgM⁺ (C).

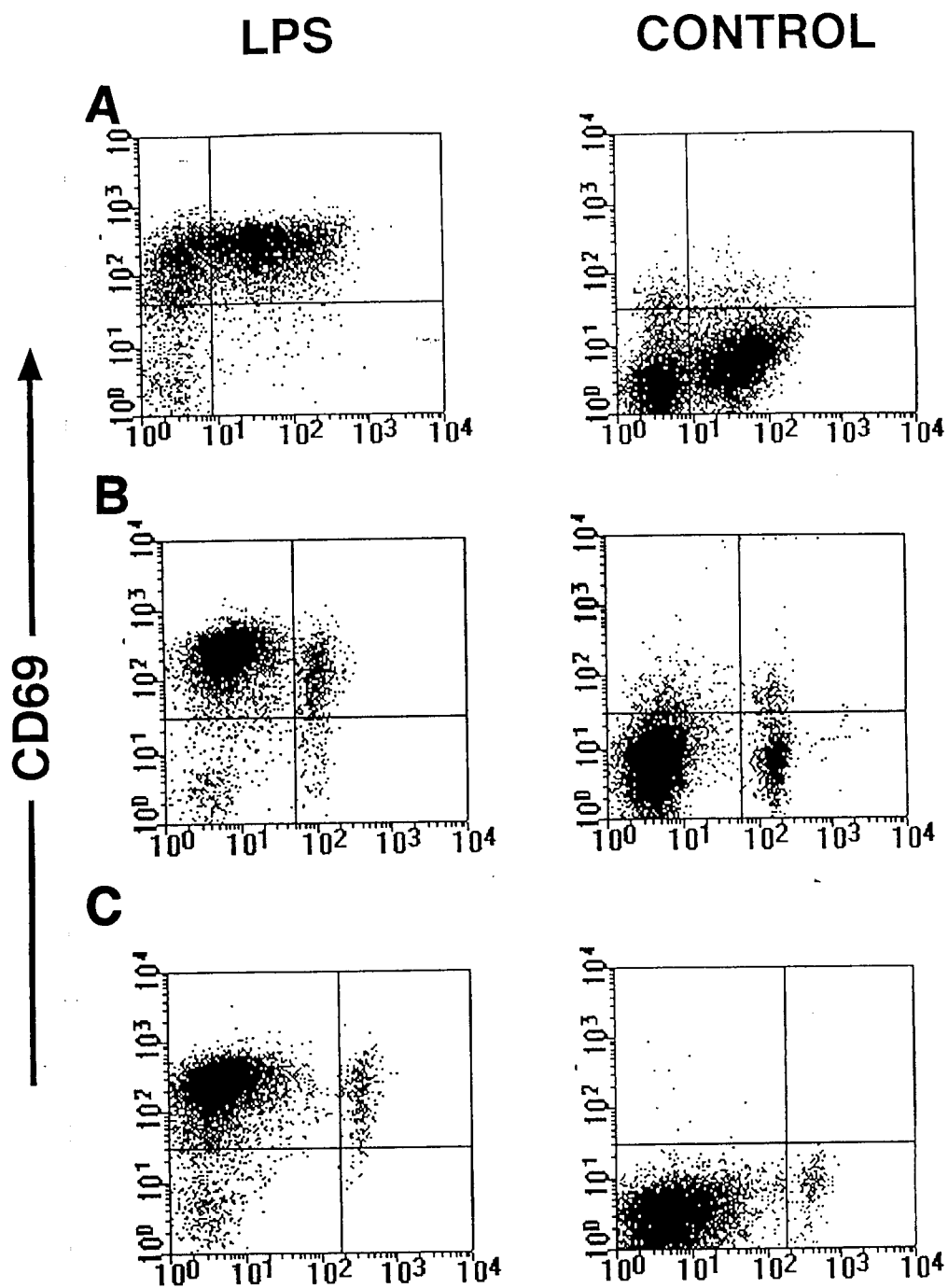


Figure 1

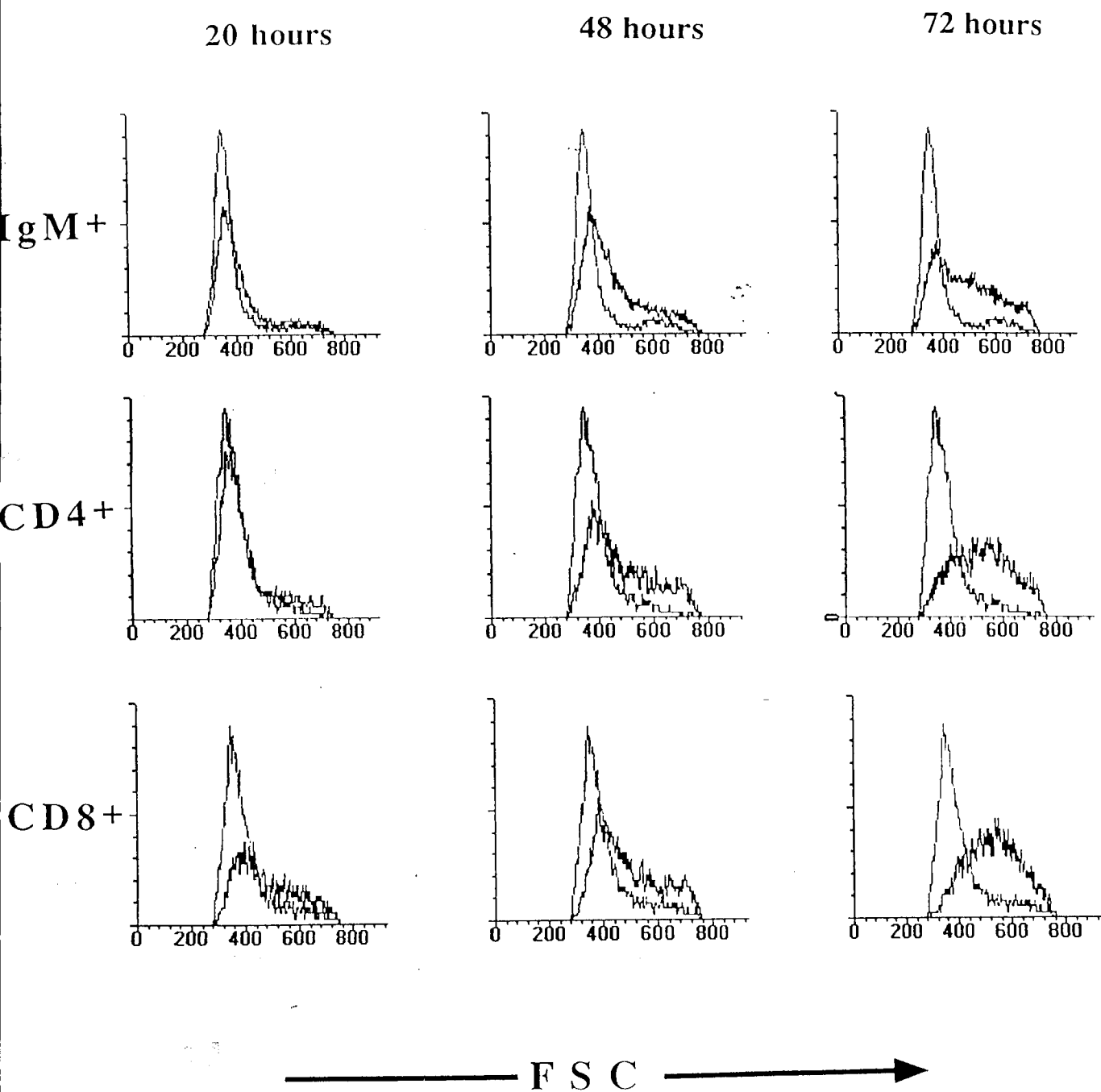


Figure 2

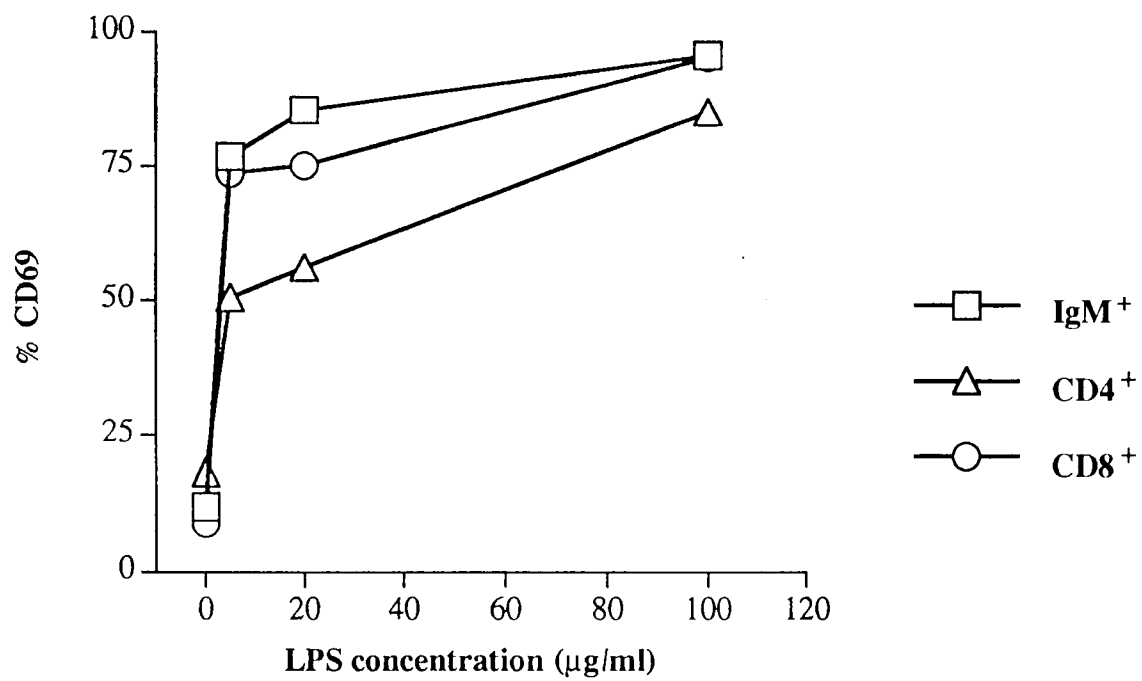


Figure 3

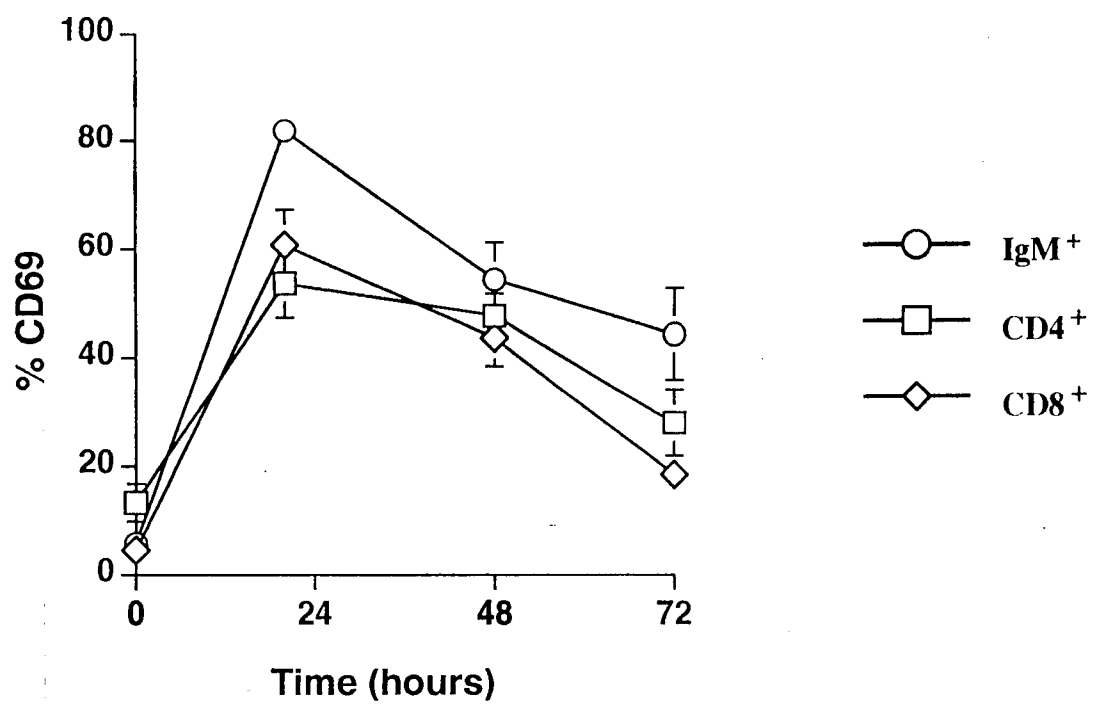


Figure 4

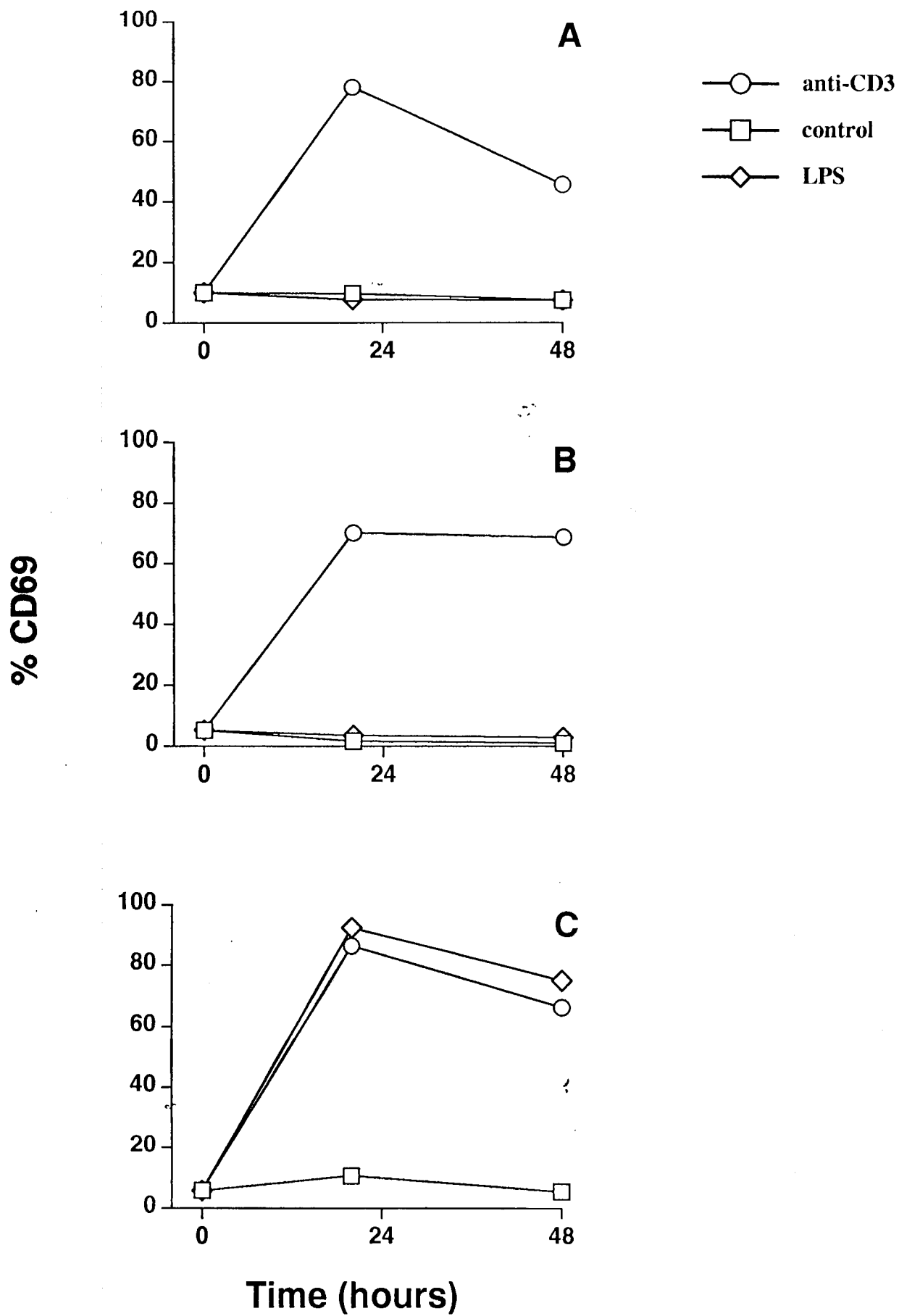


Figure 5

Table 1.

Expression of CD69 among B and T cells in spleen and lymph nodes after LPS treatment.

	Spleen		Lymph nodes	
	control	LPS	control	LPS
IgM ⁺ CD69 ⁺	14.2 ± 1.9* (2.4 ± 1.5)	76.5 ± 9.2 (46.6 ± 8.3)	17.2 ± 2.0** (2.5 ± 0.3)	83.9 ± 4.1 (13.8 ± 2.1)
CD4 ⁺ CD69 ⁺	5.5 ± 1.4 (1.8 ± 0.6)	75.7 ± 16.2 (7.9 ± 2.2)	15.8 ± 0.6 (0.9 ± 0.1)	54.6 ± 1.2 (2.8 ± 0.3)
CD8 ⁺ CD69 ⁺	2.3 ± 1.9 (0.4 ± 0.3)	91.0 ± 3.5 (3.0 ± 1.0)	14.1 ± 0.3 (0.5 ± 0.1)	60.5 ± 4.8 (1.6 ± 0.6)

* Results are represented as means ± SD of 8 mice. Total number of live IgM⁺CD69⁺, CD4⁺CD69⁺ and

CD8⁺CD69⁺ cells recovered are shown in parenthesis.

** Results concern mesenteric lymph nodes of 3 mice.

Table 2.

B10.Sc.Cr mice fail to express CD69 expression on T lymphocytes after LPS treatment

Mice	Treatment	IgM ⁺ CD69 ⁺	CD4 ⁺ CD69 ⁺	CD8 ⁺ CD69 ⁺
B10ScCr	PBS	2.4 ± 0.3*	9.2 ± 0.4	8.2 ± 2.1
B10ScCr	LPS	2.3 ± 0.3	9.0 ± 0.6	4.2 ± 1.3
C57BL/6	PBS	4.0 ± 0.6	12.8 ± 0.5	3.7 ± 0.1
C57BL/6	LPS	97.3 ± 1.7	82.9 ± 7.3	89.8 ± 4.6

* % of spleen cells expressing CD69 out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte. Results are expressed as means ± SD of 4 mice assayed independently.

Table 3.Transfer of activated B blasts into LPS-nonresponder recipients

Origin of transferred cells	Transferred cells	CD3 ⁺ CD69 ⁺	IgM ⁺ CD69 ⁺
C57BL/6	normal B cells	8.7 ± 1.0*	2.2 ± 0.4
C57BL/6	activated B blasts	23.0 ± 2.6	10.1 ± 1.5
B10.Sc.Cr	normal B cells	12.8 ± 4.4	3.8 ± 1.3
B10.Sc.Cr	activated B blasts	8.5 ± 1.6	3.5 ± 0.4

* % of spleen cells expressing CD69 out of CD3⁺ and IgM⁺ lymphocytes. Results are expressed as means ± SD of 4 mice assayed independently.

2.4. "Extensive T cell activation and apoptosis, following exposure to endotoxin from Gram-negative bacteria"

**EXTENSIVE MURINE T CELL ACTIVATION AND APOPTOSIS
FOLLOWING IN VIVO EXPOSURE TO ENDOTOXIN FROM
GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

by

Ana Castro ^{*°}, Véronique Bemer #, Paolo Truffa-Bachi #, Alberto Nóbrega *
& António Coutinho^{*,1}

Unités d'Immunobiologie* et Immunophysiologie Moléculaire #, CNRS
URA 1961, Institut Pasteur, Paris, France; Centro de Citologia Experimental,
Universidade do Porto, Portugal.

¹Author to whom correspondance should be addressed.

Abstract

Endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) from gram-negative bacteria is a well known T cell-independent B lymphocyte mitogen and macrophage/monocyte activator. While the conventional view holds that LPS is ignored by T cells, we report here that administration of LPS to mice activates all B cells, but also engages most CD4 and CD8 T cells, as measured by the expression of the activation markers CD69 and CD25, and by blast transformation. T cells recruited in the endotoxin response show altered patterns of cytokine production and massive apoptosis in the days following exposure. The present observations may contribute novel insights into the mechanisms of endotoxin shock, and of the immunological consequences of gram-negative infections.

The acute phase of infections is often complicated by the effects of microbial products, such as endotoxins from gram-negative bacteria and exotoxins from gram-positive cocci, which stimulate lymphocytes non-specifically. The activation of large numbers of T cells by superantigenic exotoxins, produce a variety of pathogenic reactions, which can lead to shock and death. Analysis of this phenomenon has contributed significant insights into the mechanisms of lymphocyte anergy and apoptosis (1). Endotoxins from gram-negative bacteria activate acute phase responses in the liver, macrophages and B cells and can also cause shock and death by mechanisms that are traditionally thought to be independent of T lymphocytes (2). We describe here the finding that administration to mice of endotoxin not only activates all B cells but also triggers, as measured by the expression of lymphocyte activation markers, up to 80% of CD4 and CD8 T cells. T cell engagement in endotoxin responses has marked functional consequences resulting in the reduced ability of CD4 T cells to produce IFN- γ , IL-4 and IL-2 and in the apoptotic death of many T cells. This observation may contribute to a better understanding of endotoxin sensitivity and shock and of the mechanisms underlying endotoxin-induced immunosuppression and autoimmunity (3, 4).

In the course of experiments involving LPS injection into mice, we have noted that the T cell population expressed the early activation marker CD69 (5). Fig. 1 and Table 1 summarise some of the results. Endotoxin treatment leads to CD69 expression by up to 95% of all B cells in spleen and lymph nodes. This result demonstrates the ability of all mature B cells to respond to LPS *in vivo* confirming previous *in vitro* observations (6). Surprisingly, the majority (> 85%) of CD4 and CD8 T cells from endotoxin-treated mice also expressed high densities of CD69, while normal untreated mice show frequencies of CD69⁺ T cells in the order of 10%. LPS-induced CD69 expression by T cells does not occur in endotoxin-resistant strains that carry a mutation at the *lps* locus in chromosome 4 (7) is LPS dose-dependent,

detectable already 12 hours after challenge and persists for a few days only (results not shown).

In addition to CD69 expression, T cells also undergo blast transformation, as assessed by light scatter parameters in flow cytometry (Fig. 2). Moreover, a high proportion of T cells (40-70%) also express IL-2 receptor α -chains (CD25) (Fig. 2), a functional marker of T cell activation (8). Potential functional alterations of T cells were tested by comparing the pattern of cytokine production by the T cells from either endotoxin-treated or control mice after *in vitro* activation with the T cell mitogen Concanavalin A. As can be seen in Fig. 3, T cells from treated mice show a reduced ability to produce IFN- γ , IL2, and IL4, while TNF- α production was kept at control levels. These results demonstrate that endotoxemia has marked functional consequences for the T cell compartment in the animal.

Since in many instances, T cell activation leads to the apoptotic death of the responding cells, we have investigated whether endotoxin would induce similar processes. As shown in Table 2, there is a substantial decrease in the numbers of T cells that can be recovered from the spleen and lymph nodes of endotoxin-treated mice, in the days following treatment. Direct quantification of apoptotic T cells by specific methods confirms these indications. As shown in Fig. 4 and Table 3, the fraction of pre-apoptotic CD4 and CD8 T cells, identified by the loss of mitochondrial membrane staining (9), increases after endotoxin administration. These results were confirmed by enumerating CD4 T cells with DNA breaks, as done by the "tunel" technique (10), in cultured cells recovered from control or endotoxin-treated mice (Table 3). The numbers of apoptotic T cells are clearly increased in mice exposed to LPS. Finally, in order to ascertain whether endotoxemia brings about a significant elimination of many T cells in the animal, we have used thymectomized mice. In these protocols, a central effect of endotoxin could be excluded and the reconstitution of peripheral T cell numbers after a putative elimination would be prevented. As can be seen in Table 2, thymectomized mice if treated with endotoxin lose up to

50% of their splenic CD4 and CD8 T cells in one week.

The present results demonstrate very marked effects of endotoxin on T lymphocytes *in vivo*. The molecular and cellular mechanisms involved are now under investigation. It seems unlikely that T cell activation is due to direct interaction with LPS, since we have failed to detect CD69 expression in purified T cells after exposure to LPS *in vitro* (data not shown), in conditions where all B-cells are activated (data not shown). Furthermore, T cells from LPS-non-responder animals will express CD69 if exposed to endotoxin in syngeneic responder mice (results not shown). The rapid kinetics of the T cell response, as well as its panclonal nature, would argue for completely non-specific mechanisms, such as the production of various cytokines, participation of acute phase reactants or complement components (11, 12). Alternatively, it is possible that LPS activation of B cells and/or macrophages, inducing hyper-expression of cell interaction molecules (11, 13), leads to secondary engagement of low affinity, self-selected cells.

It is likely that the phenomenon described here plays a role in the biological response to endotoxin, and may participate in the mechanisms leading to endotoxemic shock that continue to kill up to 100,000 patients a year, even in developed countries (14). Other immunological activities of endotoxin may also be better understood in the light of the abortive activation and apoptosis of T cells described here. Thus, endotoxin is a potent adjuvant of T cell-dependent antibody responses (15), but if administered up to 48 hours before antigen, it becomes a powerful immunosuppressor (3). Moreover, since a similar T cell expression of CD69 is also observed after treatment with other non-T mitogens from gram-negative and -positive bacteria (16), it is tempting to speculate and extend the phenomenon described here to other infections. It is well established that bacterial, but also viral and parasitic infections, are often accompanied by massive polyclonal lymphocyte activation which correlates with the immunosuppression scored in the acute phases, and with autoimmune manifestations that may follow later (4,17). The present observations could

also contribute to understand the immunobiology of infectious processes where massive T cell losses are observed such as in acquired immunodeficiency syndromes.

REFERENCES

1. P. Marrack, J. Kappler, *Science* **248**, 705 (1990).
2. J. Andersson, O. Sjoberg, G. Moller, *Transplant. Rev.* **11**, 131 (1972); R. Burrel, *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 189 (1990); J. C. Hurley, *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 268 (1995).
3. U. Persson, *J. Immunol.* **118**, 789 (1977).
4. S. Izui, N. Zaldivar, I. Scher, P. Lambert, *J. Immunol.* **119**, 2151 (1977).
5. W. Yokoyama, et al., *J. Immunol.* **141**, 369 (1988).
6. A. Cumano, K. Dorshkind, S. Gillis, C. J. Paige, *Eur. J. Immunol.* **20**, 2183 (1990); A. Grandien, Y. Modigliani, A. Coutinho, J. Andersson, *Eur. J. Immunol.* **23**, 1561 (1993).
7. A. Coutinho, L. Forni, F. Melchers, T. Watanabe, *Eur. J. Immunol.* **7**, 325 (1977); A. Coutinho, T. Meo, T. Watanabe, *Scand. J. Immunol.* **6**, 1005 (1977).
8. R. J. Robb, A. Munck, K. A. Smith, *J. Exp. Med.* **154**, 1455 (1981).
9. N. Zamzami, et al., *J. Exp. Med.* **181**, 1661 (1995).
10. Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, *J. Cell Biol.* **119**, 493 (1992).
11. R. Ulevitch, P. Tobias, *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 437 (1995).
12. J. Parillo, *New Engl. J. Med.* **328**, 1471 (1973).
13. H. Ziegler, L. Staffileno, P. Wentworth, *J. Immunol.* **133**, 1825 (1984).
14. S. Wolff, *New England J. Med.* **324**, 486 (1991); R. Stone, *Science* **64**, 365 (1994).

15. A. Johnson, V. Gaines, M. Laudy, *J. Exp. Med.* **103**, 225 (1956).
16. M. Vilanova, et al., *Scand. J. Immunol.* **43**, 155 (1996).
17. P. Minoprio, S. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa, A. Coutinho, *Immunol. Rev.* **112**, 183 (1989); J. P. Coutelier, J. T. van der Logt, F. W. Heessen, G. Warnier, J. Van Snick, *J. Exp. Med.* **165**, 64 (1987).
18. S. Nishikawa, Y. Sasaki, T. Kina, T. Amagai, Y. Katsura, *Immunogenetics* **23**, 137 (1986).
19. D. Dialynas, et al., *J. Immunol.* **131**, 2445 (1983).
20. M. Pierres, C. Goridis, P. Golstein, *Eur. J. Immunol.* **12**, 60 (1982).
21. A. Bandeira, et al., *J. Exp. Med.* **172**, 239 (1990).
22. J. L. Moreau, et al., *Eur. J. Immunol.* **17**, 929 (1987).
23. M. A. Le Moal, J. H. Colle, A. Galelli, P. Truffa-Bachi, *Res. Immunol.* **143**, 701 (1992).
24. I. Motta, J. H. Colle, B. Shidani, P. Truffa-Bachi, *Eur. J. Immunol.* **21**, 551 (1991).
25. V. Bemer, I. Motta, R. Perret, P. Truffa-Bachi, *Eur. J. Immunol.* **25**, 3394 (1995).

Table 1.

Expression of CD69 among B and T cells in spleen and lymph nodes after injection with LPS.

	Spleen		Lymph nodes	
	control	LPS	control	LPS
CD69+IgM ⁺	14.2 ± 1.9* (2.4 ± 1.5)	76.5 ± 9.2 (46.6 ± 8.3)	17.2 ± 2.0** (2.5 ± 0.3)	83.9 ± 4.1 (13.8 ± 2.1)
CD69+CD4 ⁺	5.5 ± 1.4 (1.8 ± 0.6)	75.7 ± 16.2 (7.9 ± 2.2)	15.8 ± 0.6 (0.9 ± 0.1)	54.6 ± 1.2 (2.8 ± 0.3)
CD69+CD8 ⁺	2.3 ± 1.9 (0.4 ± 0.3)	91.0 ± 3.5 (3.0 ± 1.0)	14.1 ± 0.3 (0.5 ± 0.1)	60.5 ± 4.8 (1.6 ± 0.6)

Treatments and FACS[®] analysis were performed as described in Fig.1.

* Results are represented as means ± SD of 8 mice. Total number of live CD69+IgM⁺, CD69+CD4⁺ and CD69+CD8⁺ cells recovered are shown in parenthesis.

** Results concern mesenteric lymph nodes of 3 mice.

Table 2.

A. Decrease of T cell numbers in LPS treated mice.

	Time after LPS treatment			
	0h	18h	24h	36h
IgM ⁺	49.3 ± 5.5*	47.3 ± 6.5	43.0 ± 5.5	45.9 ± 5.7
CD4 ⁺	21.8 ± 2.6	18.4 ± 3.0	16.8 ± 3.6	8.2 ± 0.8
CD8 ⁺	8.1 ± 2.2	7.4 ± 0.6	5.0 ± 0.6	3.8 ± 0.7

B. B and T cell numbers after LPS administration to thymectomized mice.

Treatment	Spleen			Lymph nodes		
	IgM ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	IgM ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Control	68.3 ±9.9	11.6 ±1.6	5.1 ±0.1	5.5 ±1.5	1.4 ±0.4	0.9 ±0.1
LPS	68.9 ±4.4	5.6 ±1.3	2.5 ±0.1	3.9 ±0.5	0.6 ±0	0.8 ±0.2

A. Treatments and FACS analysis were performed as described in Fig.1.

* Spleen cells expressing IgM, CD4 or CD8. The results are the means and 1 SD of total numbers (x10⁶) of live IgM⁺, CD4⁺ or CD8⁺ recovered per spleen at the indicated time points after LPS treatment, in 8 mice assayed independently.

B. 10-12 weeks old C57BL/6 mice thymectomized 6 weeks earlier were treated as in Fig.1. At day 7, the mice were killed, and the cells counted and analysed by FACS as described in Fig.1. Absence of remaining thymic structures was confirmed in all mice.

Results are expressed as means ± SD of total numbers (x 10⁶) of live IgM⁺, CD4⁺ or CD8⁺ in 2 mice assayed independently.

Table 3.

A. Pre-apoptotic T cells in LPS-treated mice

	Spleen		Lymph nodes	
	Control	LPS	Control	LPS
Pre-apoptotic CD4 ⁺	17.5 ± 4.6* (3.8 ± 0.9)	49.5 ± 7.5 (8.0 ± 0.8)	17.1 ± 6.0** (2.2 ± 0.6)	74.1 ± 4.0 (6.6 ± 1.0)
Pre-apoptotic CD8 ⁺	21.1 ± 0.7 (1.5 ± 0.6)	68.2 ± 4.1 (4.5 ± 0.6)	27.6 ± 1.7 (2.5 ± 0.1)	91.1 ± 4.6 (7.0 ± 1.0)

B. Proportion of CD4 T cells with DNA breaks in LPS-treated mice.

Treatment of mice	Incubation of cultures	% CD4 ⁺	% Apoptotic
PBS	37°C	21.3 ± 2.2	12.9 ± 2.3
	4°C	22.9 ± 1.3	2.2 ± 0.3
LPS	37°C	11.9 ± 2.2	21.9 ± 0.6
	4°C	12.5 ± 2.0	1.5 ± 0.5

A. Treatments and FACS[®] analysis were performed as described in Fig.4.

* % of pre-apoptotic CD4⁺ or CD8⁺ gated T cells; results are expressed as means ± SD of 8 mice. Total number of pre-apoptotic CD4⁺ or CD8⁺ cells recovered are shown in parenthesis.

**Results concern lymph nodes of 3 mice.

B. Mice treated like in Fig. 1. were sacrificed at 24h, cell suspensions prepared from spleen, cultures set up at 2x10⁶ cells/ml/well in 24 well plates and incubated for 20h in duplicates either at 37°C or at 4°C. Cells were then harvested, incubated with a biotin labeled anti-CD4 mAb, and the TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) technique applied as previously described (10), followed by FACS analysis.

The results are means and 1 SD of the values obtained in cultures of 2 mice assayed independently.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. EXPRESSION OF CD69 ON SPLENIC B AND T LYMPHOCYTES FROM LPS TREATED MICE.

Six to 8 weeks old C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with 100 μ g LPS (*Salmonella typhimurium*) or PBS, sacrificed 20 hours later, and cell suspensions prepared from spleen and lymph nodes. The cells were stained with biotinylated monoclonal antibodies (mAb) to CD69 (PharMingen), and FITC-conjugated mAbs to IgM (MB86), (18), CD4 (GK1.5, (19) or CD8 (H35.17.2, (20). Staining procedure: 2×10^6 cells in 50 μ l of FACS-buffer (PBS containing 2% BSA and 0.02% sodium azide) were incubated with antibodies for 15 min in ice, washed, streptavidin-phycoerythrin (PharMingen) added for 15 min, washed again and suspended in 500 μ l of FACS-buffer containing 0.5 μ g of propidium iodide (Fluka, Buchs, Switzerland). Analyses were performed on a FACScan II® (Becton Dickinson), excluding erythrocytes, debris and dead cells by a combination of FSC/SSC gating and propidium iodide/PE scatter plots, using the Cell Quest® program as described (21). One representative experiment out of 20 is shown. See Table 1, for statistics.

FIGURE 2: CD4 AND CD8 CELLS FROM LPS-TREATED MICE EXPRESS CD25 AND UNDERGO BLAST TRANSFORMATION.

C57BL/6 mice were injected with 10 μ g of LPS or PBS, sacrificed 20 or 48 hours later, cell suspensions prepared from spleen, and stained with PE-anti-IgM, PE-anti-CD4 or PE-anti-CD8, and FITC-anti-CD25 mAbs (22), as in Fig. 1. Panel A: forward scatter histograms of cells from control (clear) and LPS-injected (shaded) mice are represented for "gated" populations of CD4⁺ and CD8⁺ cells, as indicated, 48 hours after LPS injection. Panel B: CD25-expression histograms from control (clear) or LPS-treated (shaded)

mice, 20 after LPS injection, among "gated" populations of CD4⁺ and CD8⁺ cells. The data are representative of 3 independent experiments.

FIGURE 3: REDUCED ABILITY OF THE T CELLS FROM LPS-INJECTED MICE TO PRODUCE IL2, IL4 AND IFN- γ UPON CONCANAVALLIN A STIMULATION.

Spleen cells recovered from mice 20 hours after injection of 10 μ g LPS (or PBS), were cultured (2×10^6 /ml) with ConA (2 μ g/ml) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 5×10^{-5} M 2-ME, 2 mM glutamin and antibiotics, in 24 well plaques (1 ml/well). At the indicated times, 10^6 cells were centrifuged in Eppendorf microtubes and total RNA extracted by RNA-Quick[®] kit (Bioprobe, Montreuil Sous Bois, France), followed by cDNA synthesis performed in 20 μ l, using the cDNA kit from Boehringer (Mannheim, FGR) as previously described (23). Amplification was carried out using actin or IL2 or IL4 or IFN- γ specific primers as previously described (24). TNF α primers are : 3'-GCGACGTGGAAGTGGCAGAA; 5'-GGTACAACCCATCGGCTGGCA. The number of cycles and the amount of cDNA used were such that increasing amounts of cDNA template yielded proportionately increasing amount of specific PCR products. Semi-quantitative analysis was performed as previously described (25), by hybridisation of PCR products with ³²P-labelled specific oligonucleotide probes (25), scored with a Phosphorimager[®] (Molecular Dynamics, Sunneyvalle, CA), and shown as absorbency in arbitrary units. Revelation times: IL2, IFN- γ and TNF- α , 35 min; IL4, 4 hours. The results are representative of 3 independent experiments.

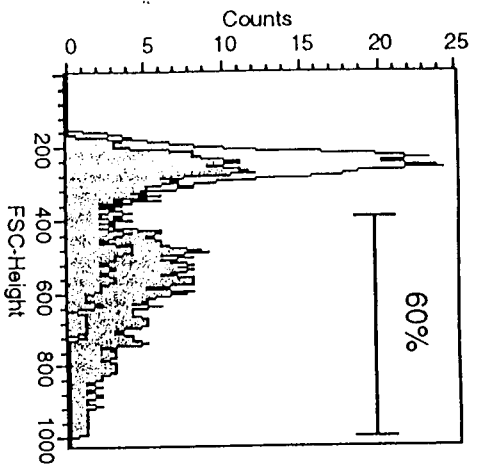
FIGURE 4. INDUCTION OF APOPTOSIS IN T CELLS AFTER LPS ADMINISTRATION IN VIVO.

Spleen cells from mice injected with 100 μ g LPS or PBS 24 hours earlier, were counted and stained with 3,3-dihexylocarbocyanine (5DiOC₆(3)) to evaluate mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), by a 15 minutes

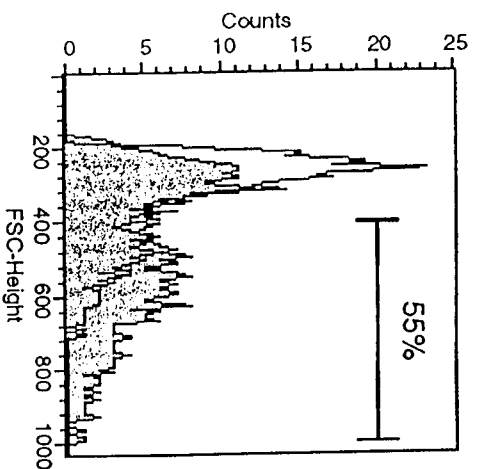
incubation with 5DiOC6(3) at 37 °C. The cells were next counter-stained with FITC-anti-CD4 or FITC-anti-CD8 and analysed as described in Fig.1. The figure shows staining profiles of CD4⁺ or CD8⁺ gated cells, the numbers inserted representing the % of pre-apototic ($\Delta\Psi_m$) and normal cells in the gated populations. One representative experiment out of 3 is shown. See Table 3 A, for statistics.

A

CD4+ cells

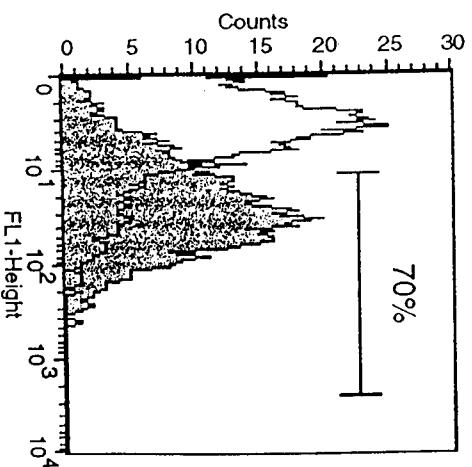
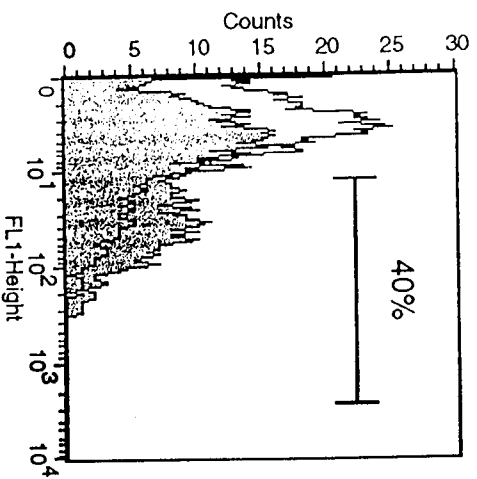


CD8+ cells



FSC

B

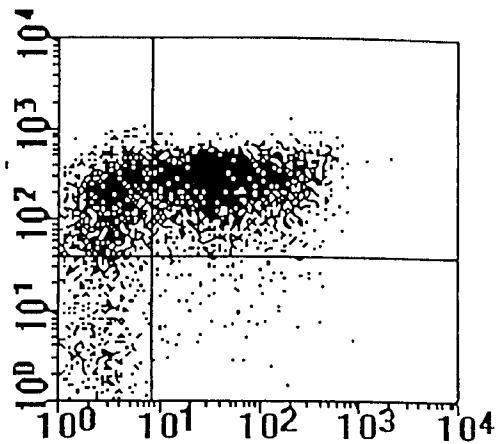
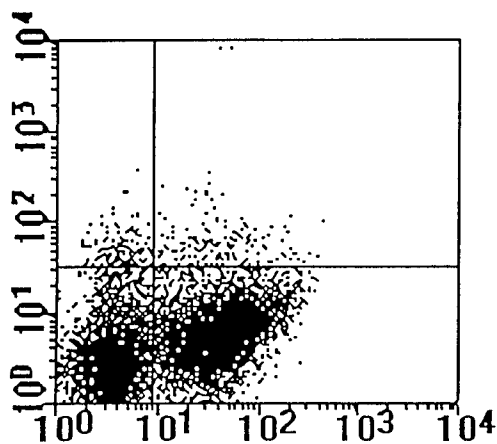


FITC-CD25

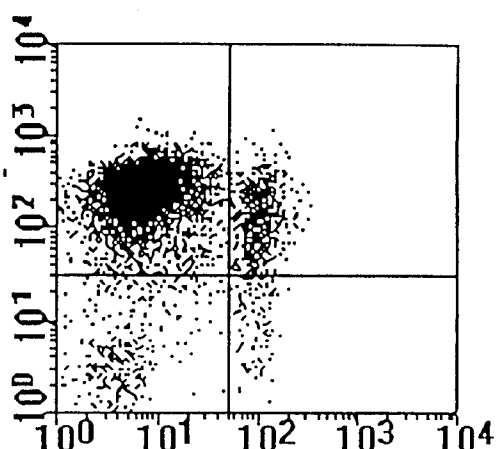
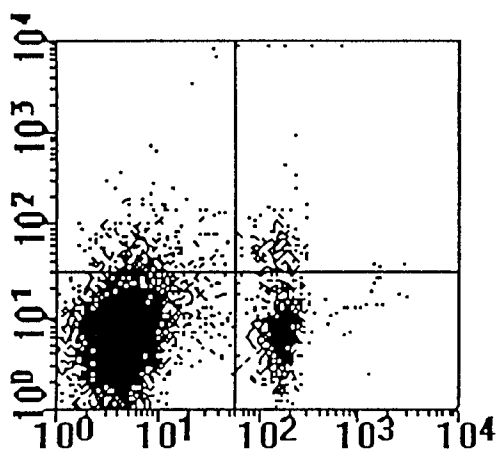
CONTROL

LPS

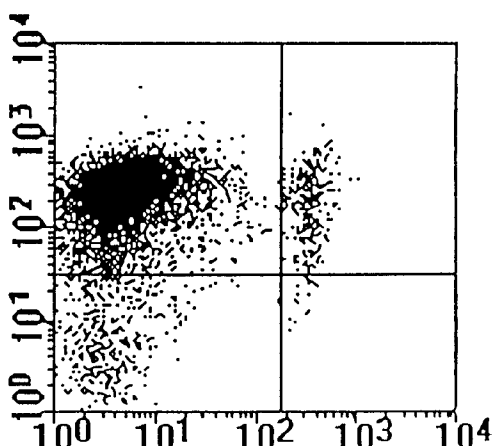
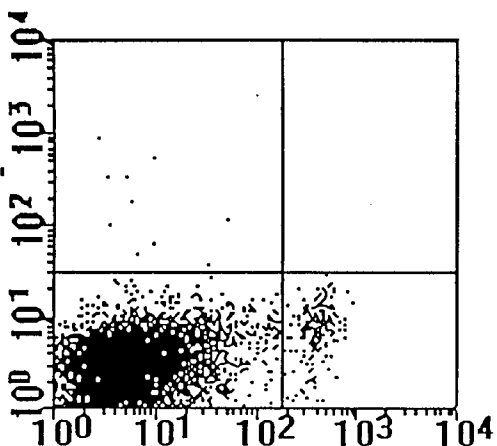
CD69



IgM

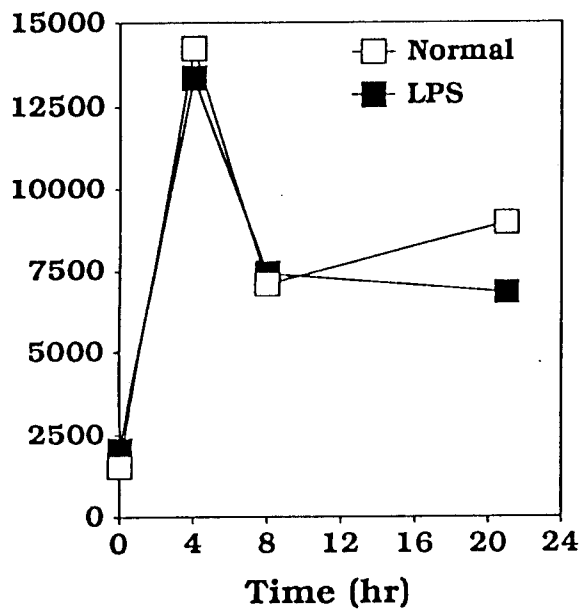


CD4

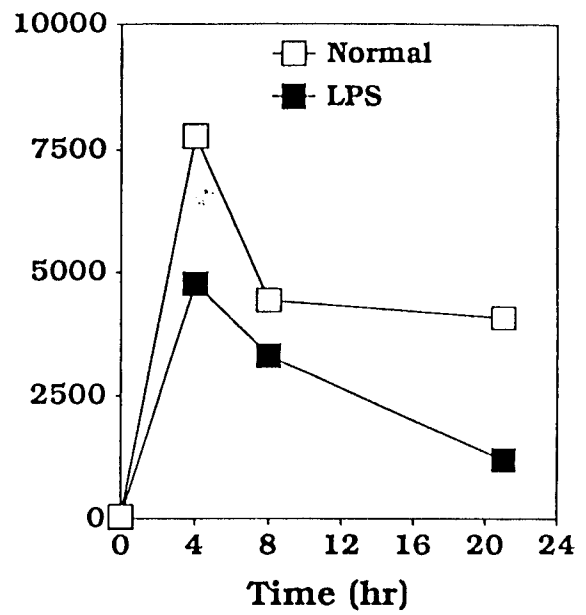


CD8

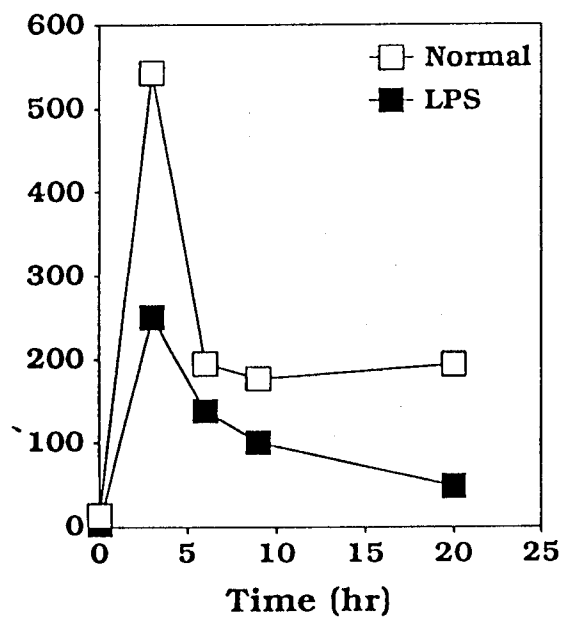
TNF- α



IL2



IL4



IFN- γ

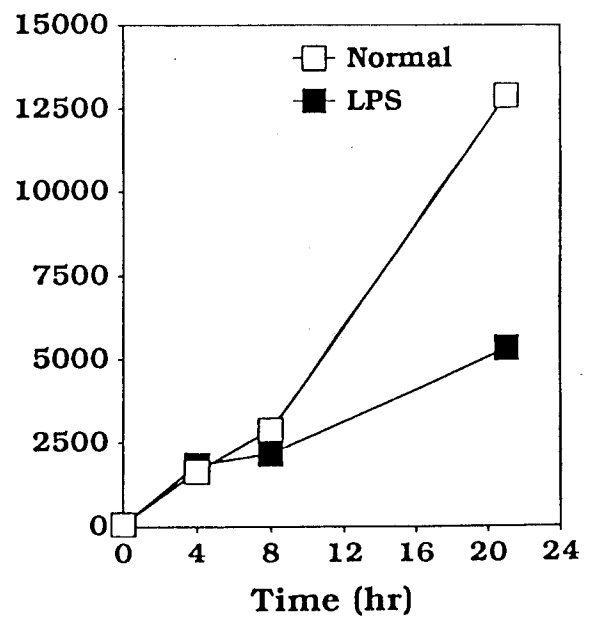
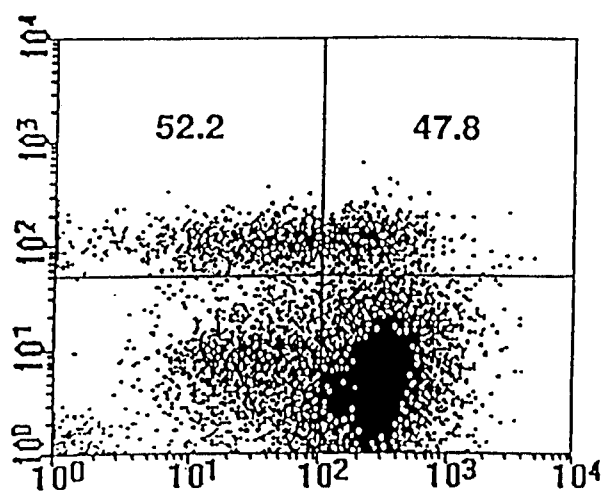
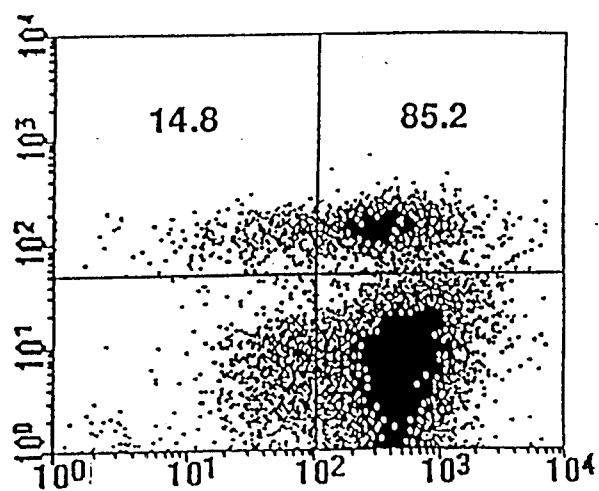


Figure 3

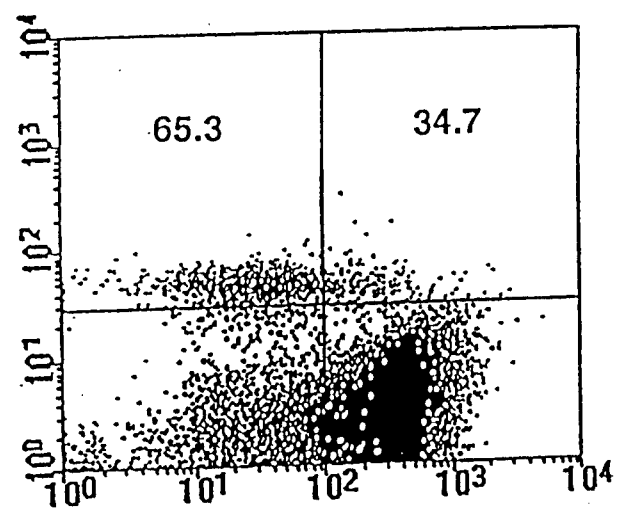
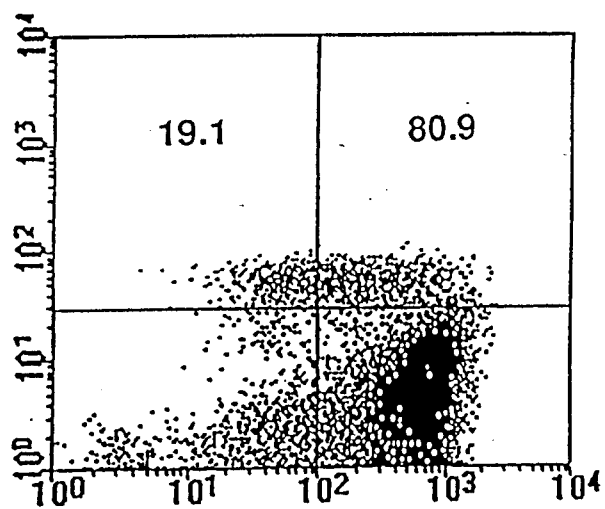
CD4

CONTROL

LPS



CD8



————— $\Delta\Psi_m$ —————>

2.5. "Experiments aiming at the definition of the mechanisms of the *in vivo* activation of T lymphocytes caused by LPS"

EXPERIMENTS AIMING AT THE DEFINITION OF THE
MECHANISMS OF THE *IN VIVO* ACTIVATION OF T
LYMPHOCYTES CAUSED BY LPS

INTRODUCTION

We have documented that LPS causes activation of T cells *in vivo*, a phenomenon that was not observed when endotoxin was added *in vitro* to T lymphocytes (see chapters 2.3 and 2.4 of this book). In order to investigate the mechanisms that participate in LPS-induced activation of T cells *in vivo*, we have decided to perform a number of experiments. In fact, a variety of mechanisms can conceivably be considered as candidate explanations for endotoxin-triggered T cell activation.

Here, we have experimentally addressed the following questions:

1. Is expression of MHC Class II molecules necessary for LPS to induce *in vivo* activation of T cells? To test this question we used "knock-out" (KO) mice lacking genes coding MHC Classe II molecules. These B6 animals have Thy-1.2 T lymphocytes and in our experiments they have received Thy-1.1 T cells from normal B6Ba mice. Therefore, the transferred T cells from the normal B6Ba mice can be easily recognized among the splenic cells of the MHC Class II KO mice. We have looked for signs of activation of the adoptively transferred Thy-1.1 T cells 20 hours after the injection of LPS to the KO mice.

2. Is the *in vivo* effect of LPS mediated by B lymphocytes? KO mice were also employed here, now the so-called μ KO mice that are not able to produce functional B lymphocytes. Again, signs of activation were searched in splenic and lymph node cells 20 hours after injection of these mice with LPS.

3. Because we had found that antibodies against anti-CD3 are able to activate *in vitro* most of B cells present in cell culture (in addition of activating T cells), we decided to ask whether the *in vivo* injection of the same anti-CD3 mAb would have the same result on B and T cells, and compare this effect with that seen after LPS administration.

4. Since increased secretion of TNF- α is known to play a central role in the systemic effects of LPS, we have investigated whether injection of recombinant TNF- α would be able, by itself (i. e., in the absence of LPS), to reproduce *in vivo* the T cell activation that we had found in mice after endotoxin injection.

5. We have asked whether repeated injection of LPS to the same mice would result in repeated and maintained activation of the same number of T cells or, instead, if it resulted in quantitative changes in frequency of activation among the T lymphocyte population of normal mice.

6. In order to better study the consequences of repeated injections of LPS in the T cell population of mice, we have also used thymectomized animals. The advantage of using these mice is that the peripheral pool of T cells is not modified by thymic output that continuously occurs in euthymic mice. Thus, in athymic mice, alterations induced by LPS on peripheral T cell number will not be masked by new T cells coming from the thymus into the periphery of the immune system.

7. Are T lymphocytes from the LPS-resistant mutant B10.Sc.Cr mouse also resistant to activation *in vitro* by endotoxin? These animals are characterized by not showing B cell activation after injection of LPS *in vivo*. It was, thus, pertinent to investigate whether the T cells from these LPS-resistant mice were also resistant to *in vitro* endotoxin-induced activation.

8. Is the *in vitro* resistance to activation of T cells capable of being overcome by adding recombinant TNF- α to cultures of splenic cells from normal B6 mice? Presumably, the concentration of TNF- α *in vivo* is higher than the concentration of the cytokine that occurs *in vitro* in the media of

splenic cell cultures treated with LPS. Therefore, we have considered the possibility that failure of T cell activation *in vitro* by LPS was due to lack of TNF- α in the culture medium, and we have, thus, supplemented the medium with rTNF- α in order to investigate the induction of T cell activation.

9. Because LPS injection to mice causes acute elevation of body temperature, we speculated whether the *in vivo* activation of the T cells was related with a heat shock effect associated with LPS-induced hyperthermia of the animals. We reasoned that, if that was the case, submitting T cells *in vitro* to heat shock might significantly increase the number of T lymphocytes that would express signs of cell activation.

MATERIALS AND METHODS

1. MHC Class II knock-out (KO) mice

These animals do not express MHC Class II molecules and have a C57BL/6 (B6) background. T cells from spleen and lymph nodes of unmanipulated B6Ba mice that have the Thy-1.1 marker (all other B6 mice, including KO animals, express the Thy-1.2 marker) were purified using the nylon wool purification method (Julius et al., 1974); 50×10^6 purified T cells of B6.Ba mice were injected in the retroorbital vein of the MHC Class II KO mice and of B6 mice (control experiments). Five hours after cell transfer, mice were injected i. p. with 50 μ g of LPS from *Salmonella thyphimurium* (obtained from Difco Laboratories, USA). The mice were sacrificed 20 hours after the LPS treatment.

Our goal was to determine whether these Thy-1.1⁺ transferred T cells would be activated by LPS in mice that lacked MHC Class II molecules. Single cell suspensions were prepared from spleen and mesenteric lymph nodes of the KO animals. Viable cells were counted using the trypan blue exclusion method in three independent samples from each preparation. The following purified mAbs were used: anti- μ^b , MB-86 (Nishikawa et al., 1986); anti-CD4, GK1.5 (Dialynas et al., 1983); anti-CD8, 53-6.72 (Ledbetter & Herzenberg, 1979); anti-Thy-1.1 (Ledbetter & Herzenberg, 1979); anti-Thy-1.2 (Ledbetter & Herzenberg, 1979); anti-CD69 (PharMingen). The mAbs were conjugated with biotin, fluorescein-isothiocyanate (FITC), or phyco-erythrin (PE) for flow cytometry (FACS) analysis. Flow cytometry was performed as described before (Bandeira et al., 1990). Erythrocytes and dead cells were excluded by a combination of FCS, SSC gating incorporation of Propidium Iodide.

2. μ knock-out (KO) mice

μ KO mice and non homozygotic littermate mice were kindly provided to us by Dr. Claus Rajewsky (University of Koln, Germany). They were employed

here to test whether absence of B lymphocytes would inhibit T cell activation caused by LPS *in vivo*. We used three homozigotic and three heterozigotic mice. Injection of mice with LPS was performed in animals that were 6-8 weeks old. As in the other experiments the animals were sacrificed 20 hours after injection of endotoxin.

3. *In vivo* injection of anti-CD3 (α CD3) monoclonal antibodies (mAb)

C57BL/6 mice were used to test *in vivo* the effect of injection α CD3 mAb. At 6-8 weeks of age, B6 mice were injected intraperitoneally with 100 μ g of α CD3 mAb (Leo et al., 1987) and the animals were sacrificed 20 hours after the inoculation. Spleen cells were then isolated in order to determine the expression of activation markers at the surface of lymphocytes by flow cytometry, as described in paragraph 1 of this section. T and B cell activation produced by α CD3 mAb was compared with that caused by LPS inoculation.

4. *In vivo* effect of injection of rTNF- α

Recombinant TNF- α (Genzyme) was injected i. p. to 6-8 weeks old C57BL/6 mice. Each mouse received 7.5×10^6 units of TNF- α . As in the other experiments the animals were sacrificed 20 hours after the administration of the cytokine. Spleen cells were isolated for the expression of surface markers of activation.

5. Effect of repeated injections of LPS

Adult C57BL/6 mice were submitted to 2 injections of LPS performed at day 0 and day 6 of the experiments and sacrificed at day 7. Spleen cells and lymph node cells were quantified and studied for expression of activation markers. The values were compared with data obtained from mice submitted

to a single injection of LPS at day 0 or at day 6, and with mice injected with PBS (controls of LPS effect).

6. *In vivo* effect of LPS in thymectomized mice

Adult C57BL/6 mice, that were thymectomized 6 weeks earlier, were injected i. p. with LPS (100 µg) according to different protocols: a) single injection of LPS at day 0; b) single injection of LPS at day 6; c) double injections of LPS at days 0 and 6. All mice were sacrificed at day 7, as the experiments of the previous paragraph. Absence of remaining thymic structures was confirmed in all mice after sacrifice. Both spleen and mesenteric lymph node cells were quantified and studied regarding the expression of activation markers.

7. *In vitro* effect of LPS on splenic cells of B10.Sc.Cr (B10) mice

Single cell suspensions were prepared from spleen of the endotoxin-resistant mutant mice known as B10.Sc.Cr animals (Coutinho et al., 1977). The number of viable cells was counted using the trypan blue exclusion method, in three independent samples from each preparation. Cultures were set up at 2×10^6 cells/ml/well in 24 well plates, in RPMI 1640 medium (Bioproducts, MD, USA) supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin (all from Flow Labs, Irvine, UK), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M) (Merck, Darmstadt, Germany), gentamycin (Unilabo, France), 10 mM HEPES buffer pH 7.3 (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 10% of a selected batch of foetal calf serum (FCS; Mannheim, Boehringer, Germany). Cultures were stimulated by addition of 25 µg/ml of LPS or 5 µg/ml of an anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) (Leo et al., 1987).

Cells were analysed by flow cytometry after respectively 20 and 48 hours of incubation, using the following purified mAbs: anti- μ^b , MB-86 (Nishikawa et al., 1986); anti-CD4, GK1.5 (Dialynas et al., 1983); anti-CD8, 53-6.72

(Ledbetter & Herzenberg, 1979) and anti-CD69 (PharMingen). The mAbs were conjugated with biotin, fluorescein-isothiocyanate (FITC), or phycoerythrin (PE) for FACS analysis. Flow cytometry was performed as described before (Bandeira et al., 1990).

8. *In vitro* effect of incubation of spleen cells with rTNF- α

Single cell suspensions were prepared with spleen cells from B6 mice. Cultures were set up at 0.5×10^6 cells into 200 μ l/well in 96-well plate, in media, as described in paragraph 7 of this section. Cultures were stimulated by addition 1 μ g/ml of rTNF- α and or 15 μ l/ml of LPS or 5 μ g/ml of α CD3. Cells were stained for flow cytometry at 20 hours of incubation, as described in paragraph 1 of this section.

9. *In vitro* effect of heat shock on activation of spleen lymphocytes

Single cell suspensions were prepared with spleen cells from B6 mice. Cultures were set up at 2.5×10^6 cells/ μ l/well in 24-well plate, in media as described in 7. The plates were kept for 4 hours at 42°C and the control plates at 37°C. After 4 hours, cells were prepared for flow cytometry, as described in paragraph 1 of this section.

RESULTS

The data that we have obtained from performing the experiments that were described in the previous pages will be presented now by documenting in separate our numerical information in tables and figures accompanied by a short text on its significance. A comprehensive and integrated discussion of these results can be found in the final chapter of this book (general discussion).

1. Experiments with MHC Class II knock-out (KO) mice

The data obtained in these experiments is summarized in the following table:

mouse	treatment	IgM ⁺ CD69 ⁺	CD4 ⁺ Thy-1.2 ⁺ CD69 ⁺	CD4 ⁺ Thy-1.1 ⁺ CD69 ⁺	CD8 ⁺ Thy-1.2 ⁺ CD69 ⁺	CD8 ⁺ Thy-1.1 ⁺ CD69 ⁺
C57BL/6	Saline	11	14	—	18	—
C57BL/6	Saline	12	18	—	19	—
C57BL/6	LPS	97	93	—	95	—
C57BL/6	LPS	58	49	—	68	—
KO	Saline	15	39	10	22	21
KO	LPS	99	63	56	77	87
KO	LPS	59	47	21	74	64

The table illustrates the percentage of cells expressing CD69 antigen (activation marker) out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in B6 mice and MHC Classe II KO mice of B6 background after treatment of the mice with LPS and in controls that were injected with saline. These experiments involve adoptive transfer of T cells from B6Ba mice (Thy-1.1⁺) into B6KO (that have Thy-1.2 marker). After being transferred to MHC Classe II KO mice of B6 background, T cells from unmanipulated B6Ba mice show CD69 expression 20 hours after LPS injection of the KO animals. The transferred cells can be

identified because they are Thy-1.1⁺ lymphocytes whereas T cells from B6 mice express the Thy-1.2 surface antigen.

The data indicate that the absence of MHC Class II molecules does not inhibit activation of T cells by LPS *in vivo*, since the majority of the transferred Thy-1.1⁺ T cells show CD69 expression after LPS treatment. It is interesting to report that a significant number of T cells (Thy-1.2⁺) from the KO mice also present surface CD69 because of the administration of LPS.

2. Experiments with μ knock-out (KO) mice

mice	treatment	CD69 ⁺ IgM ⁺	CD69 ⁺ CD4 ⁺	CD69 ⁺ CD8 ⁺
C57BL/6	Saline	2.1	7.1	3.4
C57BL/6	Saline	1.0	6.8	4.5
C57BL/6	LPS	70	48.9	53.4
C57BL/6	LPS	76.0	56.1	64.8
μ m ^{+/o}	Saline	1.6	12.8	1.1
μ m ^{+/o}	LPS	40.5	38.7	30.5
μ m ^{+/o}	LPS	60	58.7	39.0
μ m ^{o/o}	Saline	—	11.1	1.0
μ m ^{o/o}	LPS	—	44.4	31.6
μ m ^{o/o}	LPS	—	60.4	39.7

The table depicts the percentage of cells from subpopulations of splenocytes from μ KO mice and normal mice that express CD69 in animals that had received LPS 20 hours before sacrifice; controls were injected with saline. μ KO mice are devoid of functional B lymphocytes; data from both homozygotic (μ m^{o/o}) and heterozygotic (μ m^{+/o}) KO mice are shown in the table. The absence of functional B lymphocytes in the KO mice did not abrogate the expression of the CD69 antigen by T cells after LPS injection of the animals. Both μ m^{o/o} and μ m^{+/o} show T cell activation after LPS

treatment. Thus, significant expression of the activation marker in the LPS-treated KO mice shows that differentiated B cells are not required for the endotoxin-induced activation of T cells to occur *in vivo*.

3. Effect of *in vivo* injection of α CD3 mAb to B6 mice

treatment	CD69+IgM ⁺	CD69+CD4 ⁺	CD69+CD8 ⁺
saline	2.1	10.1	3.7
saline	3.6	9.3	5.1
saline	2.9	6.4	6.3
α CD3	94.1	91.3	96.9
α CD3	90.6	90.7	97.1
α CD3	97.3	95.0	97.0

B6 mice were i. p. injected with α CD3mAb 20 hours before sacrifice of the animals. Controls were injected with saline, the vehicle of the mAb. The figure reports the percentage of cells expressing CD69 out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ splenic lymphocytes.

The data show that the injection of the α CD3mAb resulted not only in the activation of the more than 90% of T cells but also of similar percentage of IgM⁺ B lymphocytes.

4. *In vivo* effect of injection of rTNF- α

treatment	CD69+IgM ⁺	CD69+CD4 ⁺	CD69+CD8 ⁺
saline	6.6 $\pm$ 1.1	18.4 $\pm$ 2.4	9.3 $\pm$ 1.5
rTNF- α	5.1 $\pm$ 0.7	17.7 $\pm$ 3.5	10.0 $\pm$ 3.1

Changes in the number of different lymphocyte subpopulations of spleen of B6 mice inoculated with recombinant TNF- α with doses that are similar to the circulating levels of the cytokine that is seen *in vivo* after LPS injection. The

figure reports the percentage of cells expressing CD69 out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ splenic lymphocytes. No significant increase in the number of lymphocytes (either B or T cells) expressing the CD69 activation marker was seen after treatment of the mice with rTNF- α . Controls were injected with saline.

5. Effect of repeated injections of LPS

treatment	time of injection	CD69+IgM ⁺	CD69+CD4 ⁺	CD69+CD8 ⁺
saline	d0	4.0 $\pm$ 0.6 (2.0 $\pm$ 0.5)	16.8 $\pm$ 0.5 (1.5 $\pm$ 0.3)	2.6 $\pm$ 0.3 (0.1 $\pm$ 0.0)
LPS	d6	97.3 $\pm$ 1.7 (41.8 $\pm$ 3.7)	83.0 $\pm$ 8.9 (7.1 $\pm$ 1.3)	88.6 $\pm$ 1.9 (2.0 $\pm$ 0.4)
LPS	d0 + d6	86.4 $\pm$ 5.7 (34.1 $\pm$ 7.0)	55.6 $\pm$ 4.1 (4.0 $\pm$ 1.3)	60.4 $\pm$ 8.5 (0.8 $\pm$ 0.2)
LPS	d0	1.5 $\pm$ 0.4 (0.5 $\pm$ 0.3)	16.0 $\pm$ 2.0 (0.9 $\pm$ 0.3)	2.2 $\pm$ 0.9 (0.1 $\pm$ 0.0)

Quantitative values of different subpopulations of splenic lymphocytes from B6 mice submitted to different protocols of injection of LPS; percentage of cells from these subpopulations that express the CD69 activation marker are illustrated in the table. Results are expressed as means $\pm$ SD of 4 mice. Total number ($\times 10^6$) of live CD69+IgM⁺, CD69+CD4⁺ and CD69+CD8⁺ cells are shown in parenthesis. The mice were submitted to LPS injection according to the following timings: d0 - single injection at day zero of the experiment; d6 - single injection at day 6 of experiment; d0 + d6 - double injection performed at day zero and day 6 of the experiments. All mice were sacrificed at day 7 of the experiment, that is 20 hours after the day 6 of injection.

The data shows that mice submitted to double injection of LPS (d0 + d6) have a significantly lower number of splenic T cells that present CD69 at their surface than mice injected with LPS 20 hours before sacrifice. This indicates that the second LPS injection is less efficient in activating T cells than the first

injection of the endotoxin. Numerical data from the d0 group of mice document that 7 days after injection of LPS, no significant increase in CD69 expression subsists in either B and T cells.

6. *In vivo* effect of repeated LPS injection in thymectomized mice

treatment	time of injection	CD69 ⁺ IgM ⁺	CD69 ⁺ CD4 ⁺	CD69 ⁺ CD8 ⁺
Saline	d0	4.5±1.7 (3.2±1.8)	23.2±4.7 (3.0±0.6)	9.0±5.5 (0.5±0.3)
LPS	d6	99.2±0.1 (58.4±0.8)	84.1±1.8 (6.3±1.2)	97.5±0.5 (2.6±0.3)
LPS	d0 + d6	61.7±2.7 (47.4±21.7)	43.9±1.6 (3.0±1.1)	37.2±6.7 (1.1±0.0)
LPS	d0	7.4±0.9 (5.1±0.1)	29.4±1.5 (1.7±0.6)	6.3±0.4 (0.2±0.0)

The same experiments that were shown in table 5, were now performed using thymectomized mice. The mice were submitted of LPS injection according with the following timing: d0 - single injection at day zero of experiment; d6 - single injection at day 6 of experiment; d0 + d6 - double injection performed at day zero and day 6 of the experiments. All mice were sacrificed at day 7 of the experiment, that is 20 hours after the day 6 of injection. The data show that mice submitted to double injection of LPS (d0 + d6), that is at day zero and day 6, have a significantly lower number of CD69⁺ splenic T cells than mice injected with LPS 20 hours before sacrifice. This indicates that the second LPS injection is less efficient in activating T cells than the first injection of endotoxin. B6 thymectomized mice were submitted to LPS injection according to the protocol described in the previous paragraph (Table 5).

7. *In vitro* effect of LPS on splenic cells of endotoxin resistant B10 mice

time of incubation	incubation of cultures	CD69+IgM ⁺	CD69+CD4 ⁺	CD69+CD8 ⁺
20 hours	control	9.8	3.40	0.4
20 hours	LPS	63.0	4.53	2.1
20 hours	α CD3	82.1	66.5	77.1
48 hours	control	7.2	2.3	0.4
48 hours	LPS	21.2	5.2	2.2
48 hours	α CD3	42.9	42.9	53.6

The table illustrates the percentage of splenic cells expressing CD69 out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of lymphocytes. Splenic cells obtained from B10 mice and submitted *in vitro* to stimulation with LPS or α CD3mAb. The B10 mice are known to be resistant to B cell activation induced by LPS. The present data show that T cells from B10 mice are not activated *in vitro* by LPS; they respond, nevertheless, with expression of the activation marker CD69 if the lymphocytes are incubated in the presence of α CD3 mAb.

8. *In vitro* effect of incubation of spleen cells from B6 with rTNF- α

Incubation of cultures	CD69+IgM ⁺	CD69+CD4 ⁺	CD69+CD8 ⁺
Control	3.5 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.2
α CD3	90.2 $\pm$ 5.7	94.1 $\pm$ 8.3	96.1 $\pm$ 4.3
LPS	93.9 $\pm$ 6.3	11.3 $\pm$ 4.1	7.1 $\pm$ 0.5
rTNF- α	4.9 $\pm$ 1.8	8.9 $\pm$ 2.3	5.2 $\pm$ 0.5

The table illustrates the percentage of spleen cells expressing CD69 out of IgM⁺, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of lymphocytes.

In vitro incubation of spleen cells from B6 mice with rTNF- α does not result in significant enhancement in the number of T or B lymphocytes expressing the activation marker CD69, as it occurs when α CD3mAb is added to the cultures; as expected, LPS was found to activate only B lymphocytes *in vitro*.

9. *In vitro* effect of heat shock on activation of spleen lymphocytes

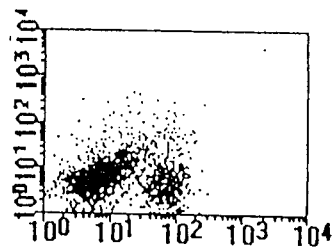
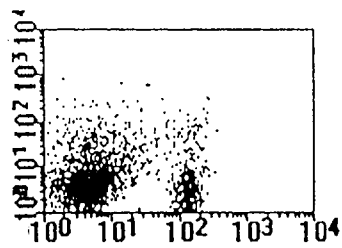
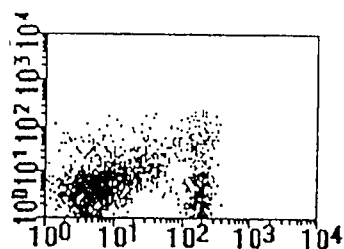
We performed experiments with total spleen cells kept *in vitro* and submitted to heat shock (42°C) to investigate whether the treatment would induce the expression of CD69 antigen. This surface marker of activation was identified by flow cytometry of the cells. As it is shown in the figure of next page, we found that heat shock treatment (the right side of the figure) did not increase the expression of CD69 in B and T lymphocytes. In addition, those experiments revealed that B cells are more sensitive to heat shock than T lymphocytes since most of the B cells were dead after the treatment, in contrast with that observed with T cells (also shown in the figure).

ex vivo

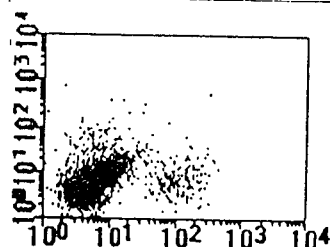
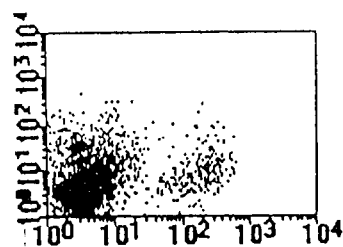
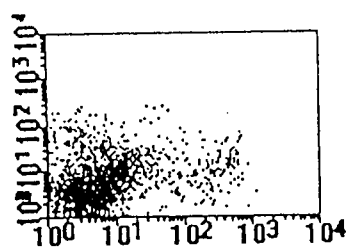
37°C

42°C

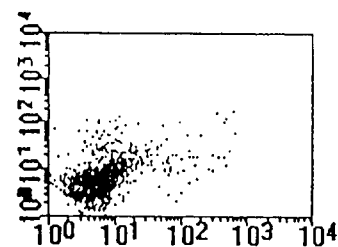
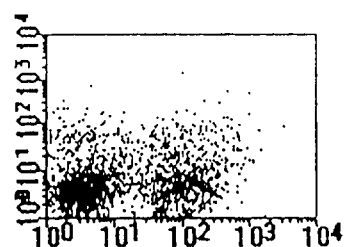
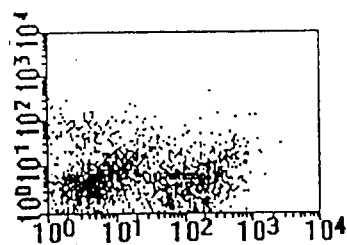
↑
CD69



→ CD4 →



→ CD8 →



→ IgM →

References

- Bandeira, A., Mota-Santos, T., Itohara, S., Degermann, S., Heusser, C., Tonegawa, S. & Coutinho, A. 1990. Localization of γ/δ T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J. Exp. Med.* **172**:239.
- Coutinho, A., Forni, L., Melchers, F. & Watanabe, T. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* **7**:325.
- Dialynas, D., Quan, Z., Wall, K., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M., Pierres, M. & Fitch, F. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK-1.5: similarity of L3T4 to the human Leu 3/T4 molecule and the possible involvement of L3T4 in class II MHC antigen reactivity. *J. Immunol.* **131**:2445.
- Julius, M.H., Simpson, E.S. & Herzenberg, L.A. 1974. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **114**:447.
- Ledbetter, J.A. & Herzenberg, L.A. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* **47**:63.
- Leo, O., Foo, M., Sachs, D.H., Samelson, L.E. & Bluestone, J.A. 1987. Identification of a monoclonal antibody specific for murine T3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:1374.
- Nishikawa, S.I., Sasaki, Y., Kina, T., Amagai, T. & Katsura, Y. 1986. A monoclonal antibody against Igh6-4 determinant. *Immunogenetics.* **23**:137.

3. Discussão

A forma que adoptei para elaborar a presente dissertação compreende a apresentação dos meus resultados experimentais, feita nos capítulos anteriores, na forma de artigo ou manuscrito científico o que, naturalmente, inclui discussão individual de cada um dos conjuntos de experiências que vieram a constituir um artigo ou um manuscrito original. A discussão dos resultados experimentais, ao contrário do que acontece nas dissertações clássicas, encontra-se, neste caso, distribuída em cada um dos capítulos antecedentes que contêm dados experimentais. Este capítulo final deve ser entendido, portanto, como uma discussão geral que sintetiza o significado da informação nova que vim a obter na execução do meu programa de doutoramento.

O trabalho experimental desta dissertação foi focado em aspectos da resposta inespecífica do hospedeiro a infecções. Assim tratámos do papel dos neutrófilos na resistência a infecção por micobactérias e da rápida e marcada activação de linfócitos que é causada *in vivo* pelo LPS das bactérias Gram-negativas.

Começarei por abordar os resultados experimentais que realizei relativamente a aspectos da resistência inespecífica do ratinho a infecção pelo *Mycobacterium avium*. O estudo experimental que apresentei no capítulo 2.1 teve como objectivo contribuir para o esforço, desenvolvido neste laboratório, no sentido de esclarecer aspectos da resistência do hospedeiro a infecções por micobactérias, particularmente no que diz respeito à possível contribuição de granulócitos na resistência a estas infecções. A possibilidade de os granulócitos terem um papel significativo na defesa do hospedeiro durante as micobacterioses corresponde a uma hipótese nova enunciada inicialmente por Manuel Teixeira da Silva e que pode ser sintetizada no seu postulado sobre a existência de cooperação entre neutrófilo e macrófago no combate às infecções por micobactérias e outros parasitas intracelulares (Silva *et al.*, 1989).

O significado dos meus resultados experimentais nesta área necessitam de integração com conceitos actuais sobre resistência do hospedeiro a infecção por micobactérias, o que passo agora a fazer. Deve ser afirmado, desde já, que os

mecanismos utilizados pelo sistema imunológico para conferir resistência ao hospedeiro a infecções por micobactérias estão longe de estar completamente elucidados (Orme, 1993). De facto, sendo a tuberculose a infecção que actualmente maior número de mortes causa em termos globais, não existe, no entanto, ainda vacinação eficaz contra esta doença (Young *et al.*, 1992). É hoje claro que a vacinação pelo BCG (*M. bovis*, Calmette-Guérin) só produz protecção parcial contra a tuberculose e é considerada como sendo virtualmente ineficaz em algumas regiões do globo (Fine, 1989). Nos últimos anos tem sido alarmante o aparecimento de novas estirpes do bacilo de Koch resistentes a todos os antibióticos conhecidos, estirpes estas que foram identificadas inicialmente sobretudo em doentes de camadas empobrecidas dos países mais desenvolvidos do mundo como os Estados Unidos da América (Bloom & Murray, 1992).

A partir de experiências de transferência adoptiva de células e da utilização de animais com “knock-out” génico, tornou-se claro que linfócitos T de ajuda (“helper”, CD4⁺) têm um papel fundamental na aquisição de resistência imunológica a infecção por micobactérias (Orme, 1993; Appelberg *et al.*, 1994; Fenton & Vermeullen, 1996). A mesma importância dos linfócitos T de ajuda na resistência às infecções por micobactérias é reflectida clinicamente na correlação que foi estabelecida nos doentes com SIDA entre o decréscimo do número de células T CD4⁺ circulantes e a expressão de doença infecciosa causada por micobactérias, seja ela a reactivação de tuberculose pulmonar ou o desenvolvimento de infecções oportunistas causadas por micobactérias atípicas, nomeadamente as induzidas por *M. avium* (Modilevsky *et al.*, 1989; Hawkins *et al.*, 1986), espécie micobacteriana que utilizei em estudos experimentais contidos nesta dissertação.

O linfócito T CD4⁺, já que não é célula com papel efector, não é, portanto, responsável pelo controlo directo feito pelo hospedeiro relativamente às infecções por micobactérias. As micobactérias são parasitas intracelulares que no hospedeiro infectado se encontram quase exclusivamente dentro de fagócitos, particularmente dentro de macrófagos, com excepção do bacilo da lepra, o qual pode também infectar

células do sistema nervoso (Fenton & Vermeullen, 1996). O macrófago é, portanto, a célula cuja capacidade antimicobacteriana irá definir em última instância se o hospedeiro terá ou não a capacidade de controlar a infecção (McDonought *et al.*, 1993). A resistência a micobacterioses conferida pelos linfócitos T de ajuda é resultado da segregação por estas células de factores humorais que, activando capacidades antimicrobianas no macrófago, fazem com que o fagócito actue de modo a impedir o crescimento intracelular das micobactérias (Flesch & Kaufmann, 1993). Entre estes factores humorais tem papel fundamental o interferão-gama (Appelberg *et al.*, 1994). Outras citocinas como o factor de necrose tumoral alfa (TNFalfa) e a interleucina 12 também têm um contribuição importante na indução de resistência do hospedeiro a infecções por micobactérias (Zhang *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1995; Appelberg *et al.*, 1995a; Fulton *et al.*, 1996). O aumento da actividade antimicobacteriana do macrófago pode ser mediado por moléculas produzidas por linfócitos T envolvidos na resposta específica a antígenos da micobactéria, assim como pode beneficiar de fenómenos não específicos associados à infecção. O macrófago, como célula do sistema de defesa desprovida da capacidade de responder especificamente a antígeno, não os distinguirá. Assim sendo, faz sentido considerar que para além dos factores activadores do macrófago que são desencadeados pela resposta específica às micobactérias, outros sinais ou moléculas poderão contribuir para ampliar a capacidade antimicrobiana dos macrófagos, isto sem pôr em causa o demonstrado papel central que os linfócitos T têm na expressão de resistência adquirida do hospedeiro a infecções por micobactérias patogénicas.

Postulados propostos por M. T. Silva indicaram um papel significativo para moléculas de granulócitos no incremento da capacidade antimicobacteriana dos macrófagos (Silva *et al.*, 1989). Esta teoria tem como dados objectivos os seguintes factos observados por M. T. Silva e colaboradores durante as infecções experimentais por micobactérias: 1) as micobactérias provocam um aumento crónico do número de granulócitos, não só no local da infecção como sistemicamente; 2) os granulócitos, sendo

células de vida curta, são removidos por fagocitose pelos macrófagos que assim poderão adquirir moléculas contidas nos granulócitos; 3) nas infecções por micobactérias encontram-se com frequência imagens de macrófagos infectados que contêm também granulócitos ingeridos; 4) é sabido que os granulócitos contêm numerosas moléculas de marcada acção antimicrobiana, uma boa parte delas em comum com o macrófago, mas outras, como a lactoferrina, mieloperoxidase e defensinas, inexistentes no macrófago. Tendo todos estes factos em linha de conta, foi elaborada por M. T. Silva nova teoria que propunha que, como resultado da fagocitose dos granulócitos pelo macrófago ou da aquisição por parte dos macrófagos de moléculas segregadas por granulócitos activados, resultaria aumento da capacidade antimicrobiana do macrófago, nomeadamente um incremento da sua capacidade de inactivar ou controlar o crescimento de micobactérias. Tratar-se-ia portanto de um fenómeno denominado de cooperação entre o neutrófilo e o macrófago, de importante significado em infecções por parasitas intracelulares, nas quais apenas o macrófago tem funções efectoras, beneficiando a célula efectora da transferência de moléculas antimicobacterianas inicialmente presentes nos granulócitos.

Apoio para esta hipótese foi obtido em vários estudos experimentais, nomeadamente pela demonstração de que a adição de homogeneizados de neutrófilo a culturas de macrófagos infectados por micobactérias resulta na diminuição do crescimento *in vitro* das micobactérias (Silva *et al.*, 1989). Dados a favor de que o neutrófilo poderá contribuir para o controlo pelo hospedeiro das infecções por micobactérias podem também ser encontradas em outros estudos realizados neste laboratório, nomeadamente em investigações que vieram esclarecer o papel do neutrófilo mesmo quando chamado na dependência de linfócitos T (Appelberg & Silva, 1989; Appelberg, 1992a; Appelberg, 1992b; Appelberg, 1992c; Appelberg *et al.*, 1995b). Também em outros laboratórios, como o de Andersen nos Estados Unidos, se demonstrou ter o neutrófilo, independentemente da sua cooperação com o macrófago, capacidade de matar bacilos de Koch, fazendo-o através de mecanismos em que não há

participação de radicais de oxigénio reactivos (Brown *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1990). No laboratório de van Furth na Holanda foi também demonstrada a capacidade de neutrófilos activados destruírem *M. fortuitum* (Geertsma *et al.*, 1990), assim como Denis no Canadá publicou evidência de que os granulócitos têm capacidade de destruir bacilos de *M. smegmatis* (Denis *et al.*, 1990).

A minha contribuição para a investigação do possível papel dos granulócitos na defesa do hospedeiro contra infecções por micobactérias partiu da seguinte pergunta: será que aumentando experimentalmente o número de granulócitos do ratinho esta alteração resultará em modificação significativa da resistência deste hospedeiro a infecção por micobactérias?

O primeiro problema com que me vi confrontada foi ao abordar esta questão o de, desenvolver um método de indução de aumento sistémico de granulócitos que fosse suficientemente duradouro para que a subida do número de granulócitos acompanhasse, durante um período significativo, a infecção experimental por micobactérias, que, como se sabe, são agentes infecciosos de crescimento lento e, portanto, agentes de infecções relativamente longas.

Não existindo na altura em que realizei as minhas experiências a possibilidade de aumentar experimentalmente apenas o número de granulócitos circulantes, o que se tornou possível mais recentemente quando o G-CSF ("Granulocyte Colony Stimulating Factor") recombinante se tornou acessível, optei por testar vários métodos de indução de inflamação não específica, com o objectivo de escolher aquele que viesse a produzir uma elevação marcada de neutrófilos, em que estas células fossem em número claramente superior à de outras células inflamatórias, nomeadamente ao das células mononucleares. A este propósito é pertinente acrescentar que resultados recentes obtidos neste laboratório por Rui Appelberg e Jorge Pedrosa após injeção de ratinhos com G-CSF, indicaram que os granulócitos induzidos *in vivo* por esta citocina poderão ter características estruturais diferentes dos granulócitos normais e, portanto, o

incremento de granulócitos mediado por G-CSF poderá não ser completamente livre de artefactos.

Como pretendia fazer infecção micobacteriana por via endovenosa, decidi que a indução da inflamação teria que ser produzida por instilação de agentes flogísticos por outra via, tendo testado o efeito de vários destes agentes após injeção intraperitoneal. Nesses estudos preliminares defini a cinética da resposta leucocitária tanto no peritoneu como no sangue periférico à injeção intraperitoneal de micropartículas de látex, de tioglicolato e de adjuvante incompleto de Freund (óleo mineral). Observei que de entre estes vários agentes inflamatórios era o óleo mineral aquele que produzia uma elevação do número de neutrófilos, tanto local como sistémicamente, mais duradoura e, simultaneamente, causava também um incremento maior de neutrófilos do que o de leucócitos mononucleares. Seleccionei assim a injeção intraperitoneal de óleo mineral como método de eleição para obter experimentalmente aumento significativo e sustentado de granulócitos circulantes e peritoniais no ratinho. Determinei também que este incremento era particularmente mantido após segunda injeção de óleo mineral, feita com uma semana de intervalo em relação à injeção inicial.

Baseada na informação obtida nestes ensaios preliminares, resolvi investigar a história natural de infecção experimental por *M. avium* em ratinhos prétratados com duas injeções de adjuvante incompleto de Freund. Tive por objectivo não só determinar se a inflamação prodrómica à injeção de micobactérias teria algum efeito no crescimento dos bacilos nos principais órgãos alvo (fígado e baço) da infecção endovenosa, como também investigar se o aumento experimental de leucócitos teria ou não igual consequência no controlo da infecção por parte de ratinhos que sabia serem geneticamente susceptíveis ou resistentes ao agente infeccioso que utilizei.

Esta segunda questão, escolha de ratinhos resistentes ou susceptíveis à infecção por *M. avium*, é fácil de abordar devido aos estudos pioneiros de vários grupos, nomeadamente o dirigido por Emil Skamene no Canadá, os quais demonstraram ser possível quanto à resposta a micobacterioses por BCG separar as estirpes "inbred" de

ratinhos em dois grandes grupos, susceptíveis ou resistentes, conforme a sua capacidade ou incapacidade de controlar infecção por micobactérias (Forget *et al.*, 1981; Gros *et al.*, 1981; Skamene *et al.*, 1982; Skamene, 1989; Appelberg & Sarmento, 1990). Esta separação do tipo de resposta das várias estirpes de ratinhos à infecção por micobactérias é resultado da expressão diferente de alelos do gene *Bcg*, de tal modo que hoje os murganhos puderam ser classificados como sendo *Bcg^r* (naturalmente resistentes) ou *Bcg^s* (naturalmente susceptíveis) (Shurr *et al.*, 1990; Vidal *et al.*, 1995). Um candidato de gene *Bcg* já foi clonado (gene *Nramp*) e a sua expressão parece corresponder a uma proteína da membrana celular do macrófago que pode estar envolvida em mecanismos de activação celular destes fagócitos (Vidal *et al.*, 1993). Para abordar esta pergunta utilizei uma estirpe de ratinho que é *Bcg^r* (C3H) e outra que é *Bcg^s* (BALB/c). Estudos deste e de outros laboratórios confirmaram que os ratinhos C3H e BALB/c comportam-se respectivamente como resistentes e susceptíveis à infecção pela estirpe 25291 do *M. avium* (Appelberg & Sarmento, 1990).

Os meus resultados experimentais demonstraram que o aumento que induzi no número de leucócitos circulantes, predominantemente de granulócitos, tem consequências diferentes nos ratinhos que são susceptíveis ao *M. avium* e naqueles que são resistentes ao mesmo parasita: enquanto que nos ratinhos BALB/c (*Bcg^s*) o incremento do número de granulócitos aumenta a sua resistência à infecção, nos ratinhos C3H (*Bcg^r*) tratados com o mesmo agente inductor de aumento de leucócitos circulantes, não se observou qualquer efeito significativo no controlo da infecção por *M. avium* por parte deste hospedeiro já de si naturalmente resistente a este parasita intracelular.

Os dados sugerem que a administração de neutrófilos a hospedeiros que sejam susceptíveis a infecções por micobactérias poderá aumentar, pelo menos temporariamente, a sua resistência a estes parasitas intracelulares (Appelberg *et al.*, 1995). É interessante referir a este propósito que, em doentes com SIDA, as infecções mais graves devidas a *M. avium*, ou a outros parasitas intracelulares, ocorrem nos pacientes com marcada diminuição do número e função granulocitária (Ellis *et al.*, 1988).

Os meus resultados experimentais também mostram que a protecção relativa contra as micobacterioses que é obtida em ratinhos BALB/c, é de natureza passageira já que ao fim de 3 meses deixa de ser observada. Esta observação pode ser interpretada como indicando que o efeito antimicobacteriano da inflamação está dependente de uma mantida elevação do número de neutrófilos, já que o incremento de neutrófilos produzido pela administração prodrómica do adjuvante incompleto de Freund apenas é observado durante as primeiras semanas que se seguem às injecções deste produto flogístico.

Observei que a adição de antígenos totais de micobactéria ao óleo mineral (ou seja, o chamado adjuvante completo de Freund) aumenta marcadamente nos ratinhos BALB/c o efeito protector contra a infecção por *M. avium* que é observado quando o óleo mineral sozinho é injectado nos animais. De facto, se pré-tratados com adjuvante completo de Freund, os ratinhos BALB/c (que recordo são naturalmente susceptíveis ao *M. avium*) passam a comportar-se como resistentes a infecções por esta micobactéria. Este resultado é relativamente surpreendente porque o consenso actualmente prevalente sobre a indução de respostas protectoras nas infecções por micobactérias é que estas respostas só são obtidas após injecção de bacilos vivos (Orme & Collins, 1983; Orme, 1988; Orme, 1992; Fenton & Vermeullen, 1996). No entanto trabalhos clássicos de Ribi e colaboradores, realizados nas décadas de cinquenta e sessenta, e já um tanto esquecidos, tinham indicado que a associação de antígenos da parede celular das micobactérias a adjuvantes podia ser utilizada como uma vacina eficaz de ratinhos contra infecções pelo bacilo da tuberculose (Larson *et al.*, 1963; Ribi *et al.*, 1966; Anacker *et al.*, 1967; Barclay *et al.*, 1967).

Em experiências adicionais determinei que este efeito protector do adjuvante completo de Freund está dependente dos linfócitos T, porque se encontra significativamente diminuído quando ratinhos BALB/c atímicos são utilizados. Podemos assim afirmar que enquanto que a inflamação inespecífica, de que é exemplo aquela que é produzida pelo óleo mineral, tem um papel protector parcial do hospedeiro contra infecção por micobactérias, efeito este que é transitório, a resposta induzida por

antígenos micobacterianos em óleo mineral resulta em protecção duradoura contra as infecções por micobactérias em animais que são geneticamente susceptíveis a estes agentes infecciosos.

No seu conjunto os meus resultados sobre as consequências da inflamação nas infecções do ratinho por micobactérias sugerem as seguintes interpretações: 1) o aumento de células inflamatórias (predominantemente granulócitos, mas também de células mononucleares) em hospedeiros susceptíveis a micobacterioses aumenta temporariamente a sua resistência à infecção; 2) em comparação com a protecção mediada por mecanismos específicos, nomeadamente por células T, os granulócitos terão um papel menos marcado do que a resposta linfocitária celular nas infecções por micobactérias; 3) em hospedeiros naturalmente resistentes às micobactérias, o aumento do número de células inflamatórias não amplia a sua resistência natural à infecção.

A descrição publicada em 1991 por Gersham e colaboradores de que existe anomalia na resposta por neutrófilos a estímulos inflamatórios no ratinho MRL/*lpr*, animais que expressam espontaneamente doença de autoimunidade a partir do 4º mês de idade, levou-me a realizar um conjunto de experiências investigando a resposta a infecção por micobactérias neste modelo animal. O estudo original de Gersham e colaboradores (Gersham *et al.*, 1991) documentou que o número de neutrófilos que é chamado à cavidade peritoneal, após injeção local de agentes flogísticos, é significativamente inferior em ratinhos MRL/*lpr* do que ratinhos congêneos que não apresentam esta mutação (animais MRL/+). Foi postulado por estes autores que esta anomalia corresponde a uma das primeiras alterações fisiológicas associadas à expressão do gene mutante *lpr*, já que ocorre desde o nascimento dos murganhos MRL/*lpr*, isto é em período em que ainda não são detectáveis níveis elevados de autoanticorpos, nem acumulação no sistema imune periférico de células T duplas negativas, como é característico dos ratinhos *lpr* a partir do 4º mês de idade, alterações estas que estão associadas à expressão nos ratinhos MRL/*lpr* de síndrome autoimune semelhante ao lupus eritematoso sistémico do Homem.

Sabia que no "background" genético dos ratinhos MRL se encontra uma estirpe (C3H) que é classificada como *Bcg^r*, ou seja estirpe expressando resistência natural a infecção por micobactérias. Tornava-se, portanto, interessante investigar se a anomalia da função neutrofílica, apesar de inserida em "background" genético de resistência inata a infecção por micobactérias, seria capaz de reverter a expressão de resistência à infecção em susceptibilidade à micobacteriose.

Com essa finalidade infectei ratinhos MRL/*lpr* e MRL/+ com *M. avium* da estirpe 25291, a qual, como disse atrás, permite distinguir murganhos com comportamento *Bcg^r* e *Bcg^S* relativamente ao seu padrão de resistência a micobacterioses. Fui determinar o crescimento da micobactéria nos principais órgãos alvo (fígado e baço) da infecção, feita por via intraperitoneal, durante um período de 4 meses após a inoculação dos bacilos que foi executada ao 3º mês de idade. Em experiências preliminares verifiquei que, em semelhança ao descrito por Gersham *et al.* (1991), a resposta neutrofílica peritoneal à injeção de micobactérias é marcadamente inferior em ratinhos MRL/*lpr* do que em murganhos MRL/+.

Observei que os ratinhos MRL/*lpr* tinham, a longo prazo, a capacidade de controlar a infecção causada pelo *M. avium* (Castro *et al.*, 1993b; ver capítulo 2.2). Este resultado indica que a expressão génica do tipo *Bcg^r* é mais importante na expressão de resistência do hospedeiro a infecção por micobactérias do que defeito na sua resposta neutrofílica. Podemos dizer que estes dados estão de acordo com a informação atrás apresentada e discutida referente às experiências que realizei estudando o efeito do incremento de neutrófilos na modulação da susceptibilidade/resistência de ratinhos *Bcg^S* (BALB/c) e *Bcg^r* (C3H) à infecção por *M. avium* (Castro *et al.*, 1993a); ver capítulo 2.1). Assim, recordei que no ratinho C3H ("background" genético do murganho MRL) encontrei que, ao contrário do que ocorria em ratinhos BALB/c (animais *Bcg^S*), o incremento do número de neutrófilos, produzido por inflamação causada por adjuvante incompleto de Freund, não se traduzia por aumento significativo da resistência inata deste animal à infecção por *M. avium*. Este resultado é, portanto, compatível com a

observação que fiz nos animais MRL/*lpr*, em que a diminuição inata que apresentam da sua resposta por neutrófilos à infecção, não se traduziu por expressão de susceptibilidade à micobacteriose. Estes dados sobre os murganhos *lpr* reforça a minha interpretação atrás apresentada, a propósito das experiências com elevação de neutrófilos, de que o neutrófilo só tem papel significativo na resposta de defesa contra a infecção por micobactérias em hospedeiros que são naturalmente susceptíveis ao agente infeccioso.

Apesar dos dois grupos de ratinhos MRL, com mutação *lpr* ou não, se comportarem como naturalmente resistentes à infecção por *M. avium*, observei que a presença da mutação *lpr* está associada a uma ligeira diminuição no grau de controlo da infecção pelo hospedeiro MRL. Detectei que esta diminuição na eficácia do combate à infecção é estatisticamente significativa. É no entanto, de natureza transitória, já que sendo detectada até ao segundo mês de infecção, desaparece dois meses depois.

Estando claramente este fenómeno de diminuição transitória de resistência associado à expressão do gene *lpr*, é tentador interpretá-lo como sendo reflexo do defeito da resposta granulocitária que é conferido pela mutação *lpr*. No entanto, sabe-se que a mutação *lpr* corresponde a alteração do gene conhecido como *Fas*, cuja expressão condiciona mecanismos subcelulares de apoptose: a linfoproliferação, de onde deriva a sigla *lpr*, é resultado da inibição de apoptose de células linfocitárias indiferenciadas que, a partir de certa altura da vida adulta dos animais *lpr*, são lançadas do timo para a periferia do sistema imunológico, indo-se acumular em órgãos periféricos como o baço e os gânglios linfáticos. Tendo em conta que este gene se expressa em múltiplas células, a diminuição de controlo da infecção, que encontrei em associação ao gene *lpr*, não pode ser interpretada, como seria tentador fazê-lo, apenas como resultado da anomalia da resposta por granulócitos que está bem documentada nos ratinhos MRL/*lpr*. De qualquer modo, não é legítimo adoptar-se a posição oposta, ou seja excluir a possibilidade do defeito da função neutrofílica associada à mutação *lpr*, ter algum

papel no aumento da susceptibilidade ao *M. avium* que os ratinhos MRL/*lpr* apresentam quando comparados com os animais seus congêneos MRL/+.

Sendo o ratinho MRL/*lpr* modelo clássico de doença autoimune (semelhante ao lupus) resolvi aproveitar os mesmos animais para investigar qual o efeito da infecção micobacteriana na história natural da sua doença espontânea de autoimunidade. Com esse objectivo estudei ratinhos MRL/*lpr*, sujeitos ou não a infecção com *M. avium*, no que diz respeito ao desenvolvimento de doença renal lúpica, monitorizada por determinação de proteinúria e análise de histologia renal; comparei também as mortalidades dos animais infectados com a dos ratinhos de controlo. Observei que a infecção micobacteriana, que recorde ter sido realizada antes dos animais apresentarem sinais de doença autoimune (ou seja aos 3 meses de idade), teve como consequência atraso significativo na cronologia do aparecimento de sinais de doença renal e também resultou numa marcada diminuição na mortalidade dos ratinhos MRL/*lpr* infectados, avaliada aos sete meses de idade dos animais. De facto, enquanto que mais de oitenta por cento dos ratinhos MRL/*lpr* infectados com *M. avium* atingem os sete meses de idade, apenas dez por cento dos controlos não infectados chegaram à mesma idade (Castro *et al.*, 1993b). Estes resultados mostram que a infecção por micobactérias tem um efeito protector contra o desenvolvimento da doença espontânea de autoimunidade dos ratinhos MRL/*lpr*. Experiências realizadas neste e em outros laboratórios mostraram que as micobactérias podem induzir efeitos semelhantes em pelo menos outro modelo de doença espontânea de autoimunidade, ou seja no modelo da diabetes de tipo 1 (insulinodependente) do ratinho NOD (Elias *et al.*, 1990; Elias *et al.*, 1991; Brás & Águas, 1996, Martins & Águas, 1996).

Ainda a este propósito, é interessante referir que a infecção por *M. avium* tem consequências opostas em outro modelo murino de síndrome semelhante ao lupus, ou seja na evolução do lupus que aparece espontaneamente no ratinho NZB/W. De facto, estudo deste laboratório, de que eu sou co-autora, mostrou que a infecção por *M. avium* acelera a evolução do lupus dos ratinhos NZB/W (Esaguy *et al.*, 1992). Tal como o

ratinho MRL/*lpr*, o murganho NZB/W é naturalmente resistente à infecção pelo *M. avium* (Esaguy *et al.*, 1992). A diferença do efeito da infecção por *M. avium* nos dois modelos murinos de lupus não surpreendente se tivermos em linha de conta que é bem conhecido que as alterações da imunofisiologia que conduzem à expressão de lupus são claramente diferentes nos dois modelos murinos da doença, os ratinhos MRL/*lpr* e NZB/W.

O programa de investigação que conduziu à elaboração da presente dissertação compreendeu o estudo de outro aspecto da resposta inespecífica do hospedeiro à infecção, ou seja os efeitos *in vivo* e *in vitro* do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas.

Ao contrário do que acontece com as infecções por micobactérias, o LPS das bactérias Gram-negativas é responsável por situações agudas que se podem tornar rapidamente fatais através da indução do choque séptico, o qual causa a morte de largas centenas de milhares de indivíduos, mesmo em países avançados, como nos Estados Unidos, em que a mortalidade devida a infecções por micobactérias é muito menor. O LPS ou endotoxina das bactérias Gram-negativas é conhecido como um agente mitogénico policlonal dos linfócitos B e como um activador de monócitos e macrófagos. Análise da literatura científica relativa aos efeitos do LPS sobre linfócitos (Coutinho *et al.*, 1975; Coutinho *et al.*, 1976; Coutinho & Meo, 1978; Coutinho, 1988) permite concluir que o LPS é considerado como uma molécula que não tem interferência na fisiologia das células T (ver por exemplo revisão de Andersson *et al.*, 1992).

Num dos estudos experimentais contidos nesta dissertação (ver capítulo 2.3) demonstrei que, em dissonância com este conceito, a administração *in vivo* de LPS a ratinhos C57BL/6 activa não só as células B como também linfócitos T, tanto da população de ajuda como da população do tipo citotóxico (apresentando o antígeno CD8⁺ à superfície celular). A activação pelo LPS destas várias subpopulações de linfócitos T foi monitorizada através da expressão de marcadores de activação celular, como são os antígenos CD69 e CD25 e, também, pela detecção de transformação

blástica das células linfocitárias. Demonstrei também que os linfócitos T, que são recrutados pela resposta à endotoxina, apresentam alterações no perfil de produção de citocinas, assim como sofrem uma marcada apoptose nos dias seguintes à exposição inicial ao LPS.

A activação de linfócitos T que encontrei em ratinhos C57BL/6 em resposta ao LPS caracteriza-se por ser um fenómeno rápido e envolvendo grande número de células. Para além da expressão de marcadores precoces de activação foi notória a blastização de linfócitos T o que, como se sabe, é sinal morfológico típico de activação de linfocitária T e B (Bandeira *et al.*, 1987). Estes fenómenos observam-se nos primeiros dias que se seguem ao tratamento *in vivo* dos ratinhos com LPS. Para confirmar que a marcada activação linfocitária detectada nas minhas experiências com ratinhos C57BL/6 era de facto devida ao LPS, e não a um qualquer contaminante, socorri-me de uma estirpe de ratinhos (B10.Sc.Cr) que apresenta uma mutação que se traduz pela não resposta dos seus linfócitos B e macrófagos ao LPS (Coutinho *et al.*, 1977; Coutinho & Meo, 1978). Detectei que tratamento *in vivo* destes ratinhos com LPS não leva nem à expressão de CD69, nem a blastização linfocitária, o que confirma ser o LPS o agente responsável pela activação linfocitária que encontrei nos murganhos C57BL/6.

É fundamental referir que só observei este fenómeno de activação de linfócitos T *in vivo*, já que em culturas de células esplénicas estimuladas com LPS apenas os linfócitos B expressavam o marcador de activação CD69 e sofriam blastização, não tendo detectado nem blastização, nem expressão de CD69, em células T *in vitro* em presença de LPS. As minhas experiências vieram estabelecer que a endotoxina tem efeitos dramáticos sobre os linfócitos T *in vivo* e, simultaneamente, deixaram em aberto o esclarecimento dos mecanismos que fundamentam este fenómeno, o que é particularmente importante tendo em conta que linfócitos T não são activáveis *in vitro* pela adição de LPS ao meio de cultura.

Realizei então uma série de ensaios experimentais com células esplénicas totais tendo como objectivo adicionar ao meio de cultura factores celulares ou moleculares que, em presença ou ausência de LPS, conseguissem reproduzir *in vitro* a activação das células T, tal como ocorria *in vivo* (ver capítulo 2.4).

A minha primeira interrogação foi a de considerar se a eventual activação de células T pelo LPS não seguiria *in vitro* uma cinética diferente daquela que observei *in vivo*. Para esclarecer esta pergunta cultivei células esplénicas totais sujeitando-as a tempos de incubação de LPS variáveis (16, 24, 36, 48 e 72 horas). Em todos estes tempos de incubação com a endotoxina, observei activação generalizada dos linfócitos B. Pelo contrário, linfócitos T continuaram a não apresentar sinais de blastização ou expressão de CD25 ou CD69. Interroguei-me de seguida se a falta de activação *in vitro* das células T em presença de LPS não seria resultado das células se tornarem refractárias a qualquer estímulo de activação. Por isso, resolvi testar o efeito da adição *in vitro* de anticorpo monoclonal anti-CD3 a esplenócitos e verifiquei não ser este o caso, já que observei, 24 horas após este tratamento, que a generalidade dos linfócitos T e, interessantemente também as células B, se encontravam activadas. A este propósito, devo acrescentar que a injeção de anticorpo anti-CD3 *in vivo* induz activação de linfócitos B e T, como acontece com o LPS.

Outra hipótese que levantei foi a de que a activação dos linfócitos T pelo LPS seria resultado não da acção directa da endotoxina, como a falta de resposta *in vitro* ao LPS parecia indicar, mas sim consequência da elevada produção de TNF- α que ocorre após o tratamento dos ratinhos com LPS. Para testar esta interpretação, estudei o efeito *in vivo* nos linfócitos T e B da injeção endovenosa de TNF- α recombinante em murganhos C57BL/6. Estas experiências foram realizadas com concentrações diferentes de TNF- α , de modo a reproduzir níveis séricos, cujos valores estão publicados, da citocina que ocorrem em resposta à administração de diferentes doses de LPS. Análise das células esplénicas destes animais tratados com TNF- α mostraram que a citocina não induz activação significativa, nem de linfócitos T, nem de células B.

Outra interrogação minha estava relacionada com o facto de saber que a administração de endotoxina causa elevação pirética significativa nos animais tratados com LPS. Esta interrogação correlaciona-se com a publicação de evidência que o choque térmico leva à expressão transitória de CD69 em linfócitos T (Risso *et al.*, 1991). Considerei a possibilidade de o efeito de activação dos linfócitos T devido ao LPS ser apenas observado *in vivo* devido à subida da temperatura corporal dos animais, já que os ensaios *in vitro* que realizara até então terem sido naturalmente executados a 37 °C. Para esclarecer esta questão decidi monitorizar a expressão de CD69 em linfócitos esplénicos sujeitos *in vitro* a 41°C durante 4 a 6 horas. Nestas experiências, não observei expressão significativa de CD69 em células esplénicas sujeitas *in vitro* a choque térmico. Interessantemente, observei que o choque térmico resultou em morte celular da maioria dos linfócitos B, enquanto que, pelo contrário a percentagem de células T mortas era pequena, o que poderá estar relacionado com conceitos actuais sobre a diferente resposta das células B e T a estímulos de "stress" (Scott *et al.*, 1996).

Também considerei a possibilidade de a activação de células B *in vivo* pelo LPS ser necessária para a activação dos linfócitos T. Experiências que realizei de transferência adoptiva de linfócitos B activados pelo LPS de ratinhos C57BL/6 para ratinhos B10.Sc.CR (que não respondem ao LPS) mostraram que os blastos B activados não são, por si só, responsáveis pela activação dos linfócitos T (ver trabalho 2.3 desta dissertação). Esta questão foi confirmada em outras experiências que fiz utilizando ratinhos sem células B funcionais (murganhos denominados de "µ knock-out") (Kitamura *et al.*, 1991) em que observei activação de linfócitos T *in vivo* após injeção de LPS nos animais.

Executei também experiências destinadas a estudar o efeito da injeção repetida de LPS *in vivo* em ratinhos C57BL/6. Estes ensaios tinham como objectivo determinar se a reindução da activação das células T seguia as mesmas características da resposta destas células a injeção única de endotoxina. Assim, estudei células esplénicas e de gânglios mesentéricos de ratinhos sujeitos a duas injeções de LPS

feitas com um espaço de 5 dias. Observei que 20 horas após a segunda injeção de LPS, a percentagem de linfócitos T que apresentavam sinais de activação era substancialmente menor do que aquela que é detectada 20 horas após a injeção única de LPS. Estes resultados sugeriam que apenas os linfócitos T que tinham saído do timo horas depois da primeira injeção de LPS e, portanto, não tinham sido activados pela presença da endotoxina em circulação, eram susceptíveis de activação pela segunda injeção de LPS.

Esta interpretação foi testada com experiências em que se utilizaram ratinhos timectomizados. Nestes animais detectei um número diminuído de linfócitos T activados em resposta à segunda injeção de endotoxina. Estes dados são consistentes com a interpretação de que não há reactivação dos mesmos linfócitos T quando se faz segunda injeção de LPS, sendo apenas activáveis as células T que correspondem ao "output" tímico que se faz horas depois da primeira administração de LPS.

Utilizando estes ratinhos timectomizados, animais em que o "pool" de linfócitos T é relativamente fixo, pude ainda concluir que injeção única de LPS reduzia o número de linfócitos T para cerca de metade 7 dias após o tratamento com a endotoxina. Estes resultados indicaram que a activação dos linfócitos T produzida pelo LPS é seguida da morte celular de um número significativo destas células. Demonstrei que esta morte celular é feita por apoptose. Proponho como possível interpretação para este fenómeno que a activação dos linfócitos T pelo LPS não seja completa, isto é que haja ausência dos sinais de co-estimulação que são necessários para a sobrevivência e proliferação das células T que ocorre quando há estimulação completa destas células.

Decidimos também estudar a produção de citocinas *in vitro* por células esplénicas de ratinhos sujeitos a tratamento com LPS. Com esta finalidade utilizámos um método semiquantitativo de PCR, que nos permitiu comparar a cinética de secreção de IL-2, IL-4, IFN- γ , e TNF- α pelos linfócitos T em resposta a estimulação com concanavalina A (que é um conhecido mitogénio de linfócitos T) tanto em animais injectados com endotoxina como em murganhos de controlo. Este estudo revelou que as células T de

animais tratados com LPS produzem quantidades significativamente menores de IL-2, IL-4 e IFN- γ do que linfócitos T dos animais de controlo. Relativamente à produção de TNF- α , após 20 horas de estimulação com Con A, foi observada produção desta citocina pelas células esplénicas de animais sujeitos a endotoxémia. No seu conjunto, estas diferenças na produção de citocinas mostram que o LPS causa alterações funcionais significativas nos linfócitos T.

A análise cinética de subpopulações linfocitárias do baço e de gânglios mesentéricos de ratinhos sujeitos a injeção de LPS indicou haver uma redução significativa do número de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, atingindo valores mínimos 36 horas após administração de endotoxina. Estes dados levantaram a suspeita de que a activação produzida pelo LPS seria seguida, nas células T, de alterações apoptóticas. A primeira abordagem que fiz a esta questão foi a de determinar a viabilidade de células esplénicas de ratinhos estimulados *in vivo* com LPS durante 24 horas e mantidos em cultura durante 12 horas. Comparação, nestas culturas, de valores de viabilidade celular de esplenócitos de ratinhos de controlo e tratados com LPS mostrou que havia um número significativamente superior de células mortas (identificadas pela incorporação de azul de tripano) nas culturas de esplenócitos de animais sujeitos a LPS relativamente a culturas de esplenócitos de animais de controlo. Fiz também em paralelo experiências mantendo culturas de linfócitos a 4°C em que observei não haver diferenças significativas na viabilidade de esplenócitos entre animais tratados com LPS e animais de controlo; este facto é consistente com a interpretação de que a perda de viabilidade das células de animais tratados com endotoxina ocorre por apoptose, já que se sabe que este processo é inibido quando as células se encontram a 4°C.

Decidi então investigar se existiam sinais de alterações apoptóticas nos linfócitos de ratinhos tratados com LPS. A escolha do método apropriado de detecção *in vivo* ou *ex vivo* de apoptose celular tem que ter em conta características da própria transformação apoptótica. Assim é necessário não esquecer que o processo de fagocitose das células apoptóticas *in vivo* é extremamente eficiente e rápido o que torna

difícil a detecção de células com sinais avançados de apoptose, antes destas serem ingeridas pelas células fagocitárias. Esta situação torna-se particularmente pertinente em tecidos que apresentam uma capacidade fagocítica elevada como são os órgãos do sistema reticuloendotelial e órgãos linfóides secundários. Este fenómeno poderá estar relacionado com observações negativas relatadas em vários estudos experimentais em que foi induzida depleção de linfócitos T, nomeadamente por administração *in vivo* de glucocorticóides (Gonzalo *et al.*, 1993), superantigénios (Kawabe & Ochi, 1991) ou de drogas citostáticas (Matsubara *et al.*, 1991); nestas investigações, surpreendentemente, não foram detectados entre linfócitos T periféricos isolados *ex vivo*, quaisquer alterações bioquímicas ou morfológicas do núcleo compatíveis com morte celular. O mesmo fenómeno foi observado na infecção por HIV que se sabe ser inductora de apoptose (Groux *et al.*, 1992).

No seu conjunto, estes resultados ilustram ser muito difícil a detecção de apoptose *ex vivo*. De modo a obviar este problema técnico, escolhi utilizar um método que identifica células pré-apoptóticas, mais fáceis de capturar do que células apoptóticas. Assim, adoptei a técnica desenvolvida pelo grupo de Guido Kroemer que se baseia na alteração do potencial transmembranar das mitocôndrias que ocorre em células pré-apoptóticas (Zamzani *et al.*, 1995). Esta alteração é observada precocemente em células que ainda não apresentam sinais nucleares de apoptose estando, no entanto, irreversivelmente condenadas a prosseguir em apoptose. Trata-se, portanto, de um método que permite a detecção precoce de células em apoptose, deste modo obviando as desvantagens que resultam, *in vivo*, de medir a apoptose monitorizando a degradação do DNA porque, como atrás salientei, este fenómeno, sendo relativamente tardio, precede por pouco tempo a remoção das células apoptóticas pelos fagócitos.

A utilização desta metodologia de monitorização de células em pré-apoptose *ex vivo* demonstrou que, de facto, há um aumento de 2 a 3 vezes no número de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, pré-apoptóticos em ratinhos que são sujeitos a injeção de LPS 24 horas antes. Este fenómeno segue uma cinética muito precisa já que até 18 horas após

a administração da endotoxina não há subida de frequência de células apoptóticas, sendo o pico máximo detectado às 24 horas, aproximando-se às 36 horas o número de linfócitos T pré-apoptóticos aos dos valores do controlo.

Tendo definido a cinética do processo apoptótico utilizando a monitorização do aparecimento de células pré-apoptóticas, decidi utilizar um método clássico de detecção directa de apoptose celular conhecido como TUNEL. O método TUNEL apresenta-se como uma alternativa à clássica electroforese de DNA em gel de agarose, permitindo informações sobre o que ocorre individualmente em cada célula, a sua localização histológica, assim como o seu grau de diferenciação. Permite ainda a fenotipagem de células em apoptose em populações heterogéneas através da dupla marcação. Caracteristicamente a célula apoptótica apresenta fragmentação de DNA de baixo peso molecular cujas quebras podem ser identificadas na técnica de TUNEL através de uma reacção enzimática mediada pela TdT em que a deoxiuridina conjugada com a fluoresceína é incorporada ao terminal OH-3' livre do DNA. Produz-se assim um polímero polideoxinucleotídico que pode ser quantificado por citometria de fluxo.

A utilização deste método mostrou que o número de linfócitos T, CD4⁺ era cerca de 2 vezes superior no grupo de ratinhos estimulados *in vivo* com a endotoxina em comparação com o de animais controlo. Não foi ainda possível determinar o mecanismo que está envolvido na apoptose dos linfócitos T de ajuda que é causada *in vivo* pelo LPS. Um dos possíveis mecanismos será a activação da apoptose utilizando a via do receptor *Fas*, já que se sabe que a expressão do gene *Fas* é aumentada pelo TNF- α , citocina que se encontra muito aumentada no soro de ratinhos tratados com LPS. Não pode também ser excluído o possível efeito tóxico do TNF- α sobre linfócitos T, como acontece em relação ao efeito da citocina sobre os timócitos (Wang *et al.*, 1994).

Publicação recente do grupo do Professor Arala-Chaves documentou, tal como aqui faço, que a administração intraperitoneal de LPS a ratinhos da estirpe C57BL/6 leva a rápido aumento da expressão do antígeno CD69 nos linfócitos T e B presentes em gânglios ou no baço dos animais tratados (Vilanova *et al.* 1996). Diferentemente dos

resultados obtidos por estes autores não encontrei subida significativa da expressão de CD69 em linfócitos T de culturas de células esplénicas totais estimuladas *in vitro* com LPS. As minhas experiências revelaram que a activação dos linfócitos T *in vivo* pelo LPS evolui secundariamente para a apoptose de número elevado destas células T, fenómeno que naturalmente poderá ter consequências importantes na imunofisiologia do hospedeiro, já que estará associado a depleção marcada e panclonal das células fundamentais do sistema imunológico, os linfócitos T.

A marcada apoptose dos linfócitos T por acção do LPS, fazendo parte da resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção por bactérias Gram-negativas, pode ser interpretada como tendo vantagem selectiva para a sobrevivência dos microrganismos. Estudos realizados pelo grupo do Professor Arala-Chaves permitiram já identificar várias proteínas microbianas, conhecidas como ISM ("microbial immunosuppressive/mitogenic"), as quais utilizam a mitogenicidade que induzem em linfócitos do hospedeiro a seu favor (Arala-Chaves *et al.*, 1979; Arala-Chaves *et al.*, 1986; Arala-Chaves *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 1991; Tavares *et al.*, 1993; Tavares *et al.*, 1995), pensamos, assim, que o LPS pode ser visto também como uma das moléculas microbianas que, sendo mitogénica, favorece o agente infeccioso na sua interacção com o hospedeiro, nomeadamente através da indução de apoptose duma larga percentagem de linfócitos T.

No momento actual das investigações que tenho vindo a realizar sobre activação de linfócitos T pelo LPS parece-me correcto concluir que os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste fenómeno estão ainda por revelar, embora os múltiplos ensaios que realizei já permitam excluir vários mecanismos que teoricamente poderiam participar na activação dos linfócitos que é mediada pela endotoxina. Assim, parece pouco provável que o mecanismo de activação dos linfócitos T pela endotoxina seja devido a interacção directa com o LPS, dado que *in vitro*, linfócitos T purificados e estimulados com LPS, não expressaram marcador precoce de activação. A cinética da resposta T desencadeia-se de uma forma tão rápida, e sendo o agente causador

policlonal, tudo parece apontar para que estejamos perante mecanismos inespecíficos, como a produção de citocinas, a participação das proteínas da fase aguda ou mesmo componentes do complemento. Como mecanismos alternativos que merecessem ser investigados deve ser considerado que a activação das células B e dos macrófagos pode levar a hiper-expressão de moléculas de interacção (MHC classe II, imunoglobulinas de superfície, moléculas de adesão, ligandos co-estimulatórios) que em situações normais apresentam graus de avidéz que se situam abaixo dos limiares de estimulação dos linfócitos T. e que poderão conduzir uma resposta secundária de células auto-seleccionadas de baixa afinidade.

Os meus estudos sobre os efeitos da endotoxina podem vir a contribuir para uma melhor compreensão de actividades imunológicas do LPS, para além das associadas directamente ao choque séptico, particularmente no que diz respeito a activação, seguida de apoptose, de células T. Os meus resultados ajudam a compreender que a endotoxina se comporte frequentemente como um potente adjuvante da resposta mediada por anticorpos T-dependentes (Johnson *et al.*, 1956), como ajuda a compreensão do facto que sendo administrada 48 horas antes do antígeno o LPS se pode tornar num potente imunossupressor. Finalmente, é minha convicção que o fenómeno de activação de linfócitos T *in vivo* exerce certamente uma função biológica na resposta à endotoxina, podendo também participar nos mecanismos conducentes ao choque séptico que continua a matar anualmente centenas de milhares de pessoas, mesmo nos países desenvolvidos (Wolff, 1991; Stone, 1994)

No seu conjunto esta dissertação ilustra a importância de mecanismos não específicos despertados pela infecção na resposta do hospedeiro aos agentes infecciosos. De facto, obtivemos informação que contribui para sugerir que os neutrófilos podem ter um papel central na defesa de hospedeiros susceptíveis a infecções por micobactérias, assim como pude revelar que o LPS injectado *in vivo* tem efeito de activação marcada de linfócitos T seguida de apoptose destas mesmas células. Estes fenómenos da resposta inespecífica do sistema imune a agentes infecciosos ilustram a

importância que mecanismos inespecíficos têm na modulação da resposta do hospedeiro em relação à infecção.

4. Bibliografia

Bibliografia

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Akbar, A.N., Borthwick, N., Salmon, M., Gombert, W., Bofill, M., Shamsadeen, N., Pilling, D., Pett, S., Grundy, J.E. & Janossy, G. 1993. The significance of low *bcl-2* expression by CD45RO⁺ T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J. Exp. Med.* **178**:427.
- Ameisen, J.C., Estaquier, J. & Idziorek, T. 1994. From AIDS to parasite infection: pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol. Rev.* **142**:9.
- Anacker, R.L., Barclay, W.R., Brehmer, W., Larson, C.L. & Ribi, E. 1967. Duration of immunity to tuberculosis in mice vaccinated intravenously with oil-treated cell walls of *Mycobacterium bovis* strain BCG. *J. Immunol.* **98**:1265.
- Andersson, J., Nagy, S., Bjork, L., Abrams, J., Holm, S. & Andersson, U. 1992. Bacterial toxin-induced cytokine production at the single-cell level. *Immunol. Rev.* **127**:69.
- Appelberg, R. 1992a. T cell regulation of chronic peritoneal neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin. Exp. Immunol.* **89**:120.
- Appelberg, R. 1992b. Interferon-gamma (IFN γ) and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 and -2 are involved in the regulation of the T cell-dependent chronic peritoneal neutrophilia of mice infected with mycobacteria. *Clin. Exp. Immunol.* **89**:269.
- Appelberg, R. 1992c. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* **51**:472.
- Appelberg, R., Castro, A.G., Gomes, S., Pedrosa, J. & Silva, M.T. 1995b. Susceptibility of Beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infect. Immun.* **63**:3381.

- Appelberg, R., Castro, A.G., Pedrosa, J., Silva, R.A., Orme, I.M. & Minóprio, P. 1994. Role of gamma-interferon and tumor necrosis factor- α during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* **62**:3962.
- Appelberg, R., Sarmiento, A. & Castro, A.G. 1995a. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in host resistance to mycobacteria of distinct virulence. *Clin. Exp. Immunol.* **101**:308.
- Appelberg, R. & Sarmiento, A.M. 1990. The role of macrophage activation and of Bcg-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **80**:324.
- Appelberg, R. & Silva, M.T. 1989. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin. Exp. Immunol.* **78**:478.
- Arala-Chaves, M.P., Higerd, T.B., Porto, M.P. 1979. Evidence for the synthesis and release of strongly immunosuppressive substances by *Streptococcus intermedius*. *J. Clin. Invest.* **64**:871.
- Arala-Chaves, M.P., Ribeiro, A.S., Vilanova, M., Porto, M.T., Santarém, M.G., Lima, M. 1988. Correlation between B cell mitogenicity and immunosuppressor effects of a protein released by porcine monocytes infected with African Swine Fever Virus. *Am. J. Vet. Res.* **9**:1955.
- Arala-Chaves, M.P., Ribeiro, Santarém, M.G., Coutinho, A. 1986. Strong mitogenic effect for murine B lymphocytes of an immunosuppressor substance released by *S. intermedius*. *Infect. Immunol.* **54**:543.
- Bandeira, A., Larsson, E.-L., Forni, L., Pereira, P. & Coutinho, A. 1987. *In vivo* activated splenic T cells are refractory to interleukin 2 growth *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* **17**:901.
- Barclay, W.R., Anacker, R.L., Brehmer W. & Ribi, E. 1967. Effect of oil-treated mycobacterial cell walls on organs of mice. *J. Bacteriol.* **94**:1736.
- Beutler, B. & Cerami, A. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**:584.

- Bloom, B.R. & Murray, C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**:1055.
- Bluestone, J.A. 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell co stimulation. *Immunity* **2**:555.
- Bradley, L.M., Croft, M. & Swain, S.L. 1993. T cell memory: new perspectives. *Immunol. Today* **14**:197.
- Brás, A. & Águas, A.P. 1996. Diabetes-prone NOD mice are resistant to *Mycobacterium avium* and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* **89**: 20.
- Bretscher, J.A. & Cohn, M. 1970. A theory of self-nonself discrimination. *Science* **169**:1042.
- Brett, S., Orrel, J.M., Swanson Beck, J. & Ivanyi, J. 1992. Influence of H-2 genes on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lung of chronically infected mice. *Immunology* **76**:129.
- Brown, A.E., Holtzer, T.J. & Andersen, B.R. 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **156**:985.
- Cannon, J.R., Tompkins, R.G., Gelfand, J.A., Michie, H.R., Stanford, G.G., van der Meer, J.W.M., Endres, S., Lonnemann, G., Coesetti, J., Chernow, B., Wilmore, D.W., Wolff, S.M., Burke, J.F. & Dinarello, C.A. 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* **161**:79.
- Castro, A.G., Silva, R. & Appelberg, R. 1995. Endogenously produced interleukin-12 required for the induction of protective T cells during *Mycobacterium avium* infection in mice. *J. Immunol.* **155**:2013.
- Castro, A.P., Águas, A.P. & Silva, M.T. 1993a. Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice. *Clin. Exp. Immunol.* **92**:466.

- Castro, A.P., Esaguy, E. & Àguas, A.P. 1993b. Effect of mycobacterial infection in the lupus prone MRL/lpr mice: enhancement of life span of autoimmune mice, amelioration of kidney disease and transient decrease in host resistance. *Autoimmun.* **16**:159.
- Cosulich, M.E., Rubartelli, A., Risso, A., Cozzolino, F. & Bargellesi, A. 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4205.
- Coutinho, A. 1988. Immunobiology of B lymphocytes. Mani. In *Lymphocyte Activation and Differentiation*. Walter de Gruyter 553.
- Coutinho, A., Forni, L., Melchers, F. & Watanabe, T. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* **7**:325.
- Coutinho, A., Gronowicz, E. & Möller, G. 1975. Signals and receptors in B-cell activation. Rosenthal. *Immune Recognition*. Academic Press 63.
- Coutinho, A., Gronowicz, E., Möller, G. & Lemke, H. 1976. Polyclonal B cell activators (PBA). Rosenstreich. *Mitogens in Immunobiology*. Academic Press 173.
- Coutinho, A. & Meo, T. 1978. Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice. *Immunogenetics.* **7**:17.
- Creasey, A.A., Stevens, P., Kenny, J., Allison, A.C., Warren, K., Catlett, R., Hinshaw, L. & Taylor, F.B. 1991. Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ. Shock* **33**:84.
- Croft, M. 1994. Activation of naive, memory and effector T cells. *Cur. Op. Immunol.* **6**:431.
- Cross, A.S. & Opal, S.M. 1995. Endotoxin's role in Gram-negative bacterial infection. *Cur. Op. Infect. Dis.* **8**:156.
- Curtis, B.M., Widmer, M.B., deRoos, P. & Qvarnstrom, E.E. 1990. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J. Immunol.* **144**:1295.
- Davidson, P.T., Khanijo, V., Goble, M. & Moulding, T.S. 1981. Treatment of disease due to *Mycobacterium intracellulare*. *Rev. Infect. Dis.* **3**:1025.

- Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Gervais, F. & Skamene, E. 1990. Killing *Mycobacterium smegmatis* by macrophages from genetically susceptible and resistant mice. *J. Leukocyte Biol.* **47**:25.
- Denner, J.C., Tsang, A.Y., Chatterjee, D. & Brennan, P.J. 1992. Comprehensive approach of serovars of *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* **30**:473.
- Dinarello, C.A. 1988. Biology of IL-1. *FASEB J.* **2**:108.
- Doe, W.F. & Henson, P.M. 1978. Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect of tumor target cells. *J. Exp. Med.* **148**:544.
- Doe, W.F., Yang, S.T., Morisson, D.C., Betz, S.J. & Henson, P.M. 1978. Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. II. Evidence for differentiation signals delivered by lipid A of lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **148**:577.
- Elias, D., Markovits, D., Reshef, T., van der Zee, R. & Cohen, I.R. 1990. Induction and therapy of autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65 KDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:1576.
- Elias, D., Reshef, T., Birk, O.S., van der Zee, R., Walker, M.D. & Cohen, I.R. 1991. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T cell epitope of the human 65 KDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:3088.
- Ellis, M., Gupta, S., Galant, S. & Hakim, S. 1988. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive study. *J. Infect. Dis.* **158**:1268.
- Ellis, R.E., Erard, R.E., Yuan, J. & Horvitz, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**:663.
- Elsbach, P. & Weiss, J. 1993. Bactericidal/permeability increasing protein and host defense against Gram-negative bacteria and endotoxin. *Cur. Op. Immunol.* **5**:103.
- Esaguy, N., Macedo, P.M., Castro, A.P. & Águas, A.P. 1992. Acquisition of autoimmunity genes by New Zealand mice is associated with natural resistance to infection by mycobacteria. *J. Autoimmun.* **5**:641.

- Fenton, M.J. & Vermeullen, M.W. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.* **64**:683.
- Fine, P.E. 1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* **11**:53.
- Flesch, I.E. & Kaufmann, S.K. 1993. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* **189**:316.
- Forge, L.E. & Remick, D.G. 1990. Kinetics of $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and IL-8 gene expression in LPS stimulated human whole blood. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **174**:18.
- Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Mialhe, A.C. & Turcotte, R. 1981. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of *Mycobacterium bovis* (BCG). *Infect. Immun.* **32**:42.
- Freeman, G.B., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., Mckight, A.J., Kim, J., Du, L.N., Lombard, D.B., Gray, G.S., Nadler, L.M. & Sharpe, A.H. 1993. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* **262**:907.
- Freudenberg, M.A., Kumazawa, Y., Meding, S., Langhorne, J. & Galanos, C. 1991. Gamma interferon production in endotoxin-responder and non-responder mice during infection. *Infect. Immun.* **59**:476.
- Fulton, S.A., Johnsen, J.M., Wolf, S.F., Silburth, D.S. & Boom, W.H. 1996. Interleukin-12 production by human *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect. Immun.* **64**:2523.
- Gavioli, R., Risso, A., Smilovich, D., Baldissarro, I., Capra, M.C., Bargallesi, A. & Cosulich, M.E. 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell. Immunol.* **142**:186.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**:493.

- Ge, Y., Ezzel, R.M., G., T.R. & Warren, H.S. 1994. Cellular distribution of endotoxin after injection of chemically purified lipopolysaccharide differs from that after injection of live bacteria. *J. Infect. Dis.* **196**:95.
- Geertsma, M.F., Nibbering, P.H., Post, O. & van Furth, R. 1990. Interferon-activated human granulocytes kill ingested *Mycobacterium fortuitum* more efficiently than normal granulocytes. *Eur. J. Immunol.* **20**:869.
- Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**:287.
- Gershman, H., Ray, C.J. & A., O. 1991. Defective neutrophil function in the autoimmune mouse strain MRL/lpr. *J. Immunol.* **146**:391.
- Gery, I., Kruger, J. & Spisel, S. 1972. Stimulation of B lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T6T6 thymus grafts. *J. Immunol.* **108**:1088.
- Goldstein, P., Ojcius, D.M. & Young, J.D.E. 1991. Cell death mechanism and the immune system. *Immunol. Rev.* **121**:29.
- Golovkina, T.V., Chervonsky, A., Dudley, J. & Ross, S. 1992. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* **69**:637.
- Gonzalo, J.A., González-García, A., Martínez-A., C. & Kroemer, G. 1993. Glucocorticoid-mediated control of clonal deletion and activation of peripheral T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* **177**:1239.
- Goto, Y., Buschman, E. & Skamene, E. 1989. Regulation of host resistance to *Mycobacterium intracellulare* *in vivo* and *in vitro* by the *Bcg* gene. *Immunogenetics* **30**:218.
- Goulding, N.J. & Guyre, P.M. 1993. Glucocorticoids, lipocorticoids and the immune response. *Cur. Op. Immunol.* **5**:108.
- Gros, P., Skamene, E. & Forget, A. 1981. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.* **127**:2417.

- Groux, H., Torpier, G., Monté, D., Moutou, Y., Capron, A. & Ameisen, J.C. 1992. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.* **175**:331.
- Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M. & Wright, S.D. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* **179**:269.
- Hailman, E., Vasselon, T., Kelley, M., Busse, L.A., Hu, M.C.-T., Lichenstein, H.S., Detmers, P.A. & Wright, S. 1996. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J. Immunol.* **156**:4384.
- Hara, T., Jung, L.K.L., Bjorndahl, J.M. & Fu, S.M. 1986. Human T cell activation III. Rapid induction of phosphorylated 28kD disulfide-linked early activation. *J. Exp. Med.* **164**:1988.
- Harris, H.W., Grunield, C., Feingold, K.R., Read, T.F., Kane, J.P., Jones, A.L., Eichbaum, E.B., Bland, C.B. & Rapp, J. 1993. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J. Clin. Invest.* **91**:1023.
- Harshan, K.V. & Gangadharam, P.R. 1991. *In vivo* depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of *Mycobacterium avium* complex in mice. *Infect. Immun.* **59**:2818.
- Hawkins, C.C., Gold, J.W.M. & Wimbey, E. 1986. *Mycobacterium avium* complex in infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Inter. Med.* **104**:994.
- Haziot, A., Tsuberi, B.-Z. & Goyert, S.M. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **150**:5556.
- Hechtman, D.H., Cybulsky, M.I., Fuchs, H.J. & Gimbrone, M.A.J. 1991. Intravascular IL-8 inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol.* **147**:883.

- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. 1994. *C. Elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**:665.
- Hirohashi, N. & Morrison, D.C. 1996. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production *in vivo*. *Infect. Immun.* **64**:1011.
- Hormaeche, C.E., Harrington, K.A. & Josey, H.S. 1985. Natural resistance to *Salmonellae* in mice. *J. Infect. Dis.* **152**.
- Inderlied, C.B., Kemper, C., A. & Bermudez, L.E.M. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:266.
- Jenkins, M.K., Ashwell, J.D. & Schwartz, R.H. 1988. Allogenic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **140**:3324.
- Johnson, A.J., Gaines, V. & Laudy, M. 1956. Studies of O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of the antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **103**:225.
- Jones, G.S., Amirault, H.J. & Andersen, B.R. 1990. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a non-oxidative process. *J. Infect. Dis.* **162**:700.
- Ju, S., T., Cui, H.L., Panka, D.J., Ettinger, R. & Marshak-Rothstein, A. 1994. Participation of target *Fas* protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ TH1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4185.
- June, C.H., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S. & Thompson, C.B. 1990. Role of CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today.* **11**:211.
- Kagi, D., Vignaux, F., Lederman, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H. & Goldstein, P. 1994. *Fas* and perforin pathways as major mechanisms of T-cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**:528.
- Kawabe, Y. & Ochi, A. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺CD4T⁺ cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* **349**:245.

- Kerr, J.F.R. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**:13.
- Kikutani, H., Kimura, R., Nakamura, H., Sato, R., Muraguchi, A., Kawamura, N., Hardy, R.R. & Kishimoto, T. 1986. Expression and function of an early activation marker restricted to human B cells. *J. Immunol.* **136**:4019.
- Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R. & Rajewsky, K. 1991. A B-cell deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature.* **350**:423.
- Krammer, P.H., Dhein, J., Walczar, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P.T., Knipping, E., Westendorp, M.O., Stricker, K., Baumler, C., Hellbardt, S., Germer, M., Peter, M.E. & Debatin, K.-M. 1994. The role of APO-1 mediated apoptosis in the immune system. *Immunol. Rev.* **142**:175.
- Larson, C.L., Ribi, E., Witch, W.C., List, R.H. & Goode, G. 1963. Resistance to tuberculosis in mice immunized with BCG disrupted oil. *Nature* **198**:1214.
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M. 1964. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.* **10**:634.
- Luster, M.L., Gernnolec, D.R., Yoshida, T., Kayama, M. & Thompson, M. 1994. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology* **19**:480.
- Lynch, D.H., Ramsdell, F. & R., A.M. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of the immune responses. *Immunol. Today* **16**:569.
- Marrack, P., Hugo, P., McCormack, J. & Kappler, J. 1993. Death and T cells. *Immunol. Rev.* **133**:119.
- Martins, T.C. & Águas, A.P. 1996. Changes in B and T lymphocytes associated with mycobacteria-induced protection of NOD mice from diabetes. *J. Autoimm.* **9**: 561.
- Matsubara, K.M., Knbota, M., Kuwaakado, K., Hirota, H., Wakazono, Y., Akiyama, Y., Mikawa, H. & Adachi, S. 1991. Induction of apoptosis in childhood acute leukemia by chemotherapeutic agents: failure to detect evidence of apoptosis *in vivo*. *Eur. J. Haematol.* **52**:47.

- McDonought, K.A., Kress, Y. & Bloom, B.R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* **61**:2763.
- Modilevsky, T., Staller, F.R. & Barnes, P.F. 1989. Mycobacterial diseases in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch. Intern. Med.* **149**:2201.
- Mossman, T.R. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol. Today* **12**:A49.
- Munk, A., Guyre, P.M. & Holbrook, N.J. 1984. Physiologic functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **5**:25.
- Nagata, S. & Goldstein, P. 1995. The *Fas* death factor. *Science* **267**:1499.
- Ohta, M., Nakashima, I. & Kato, N. 1982. Adjuvant action of bacterial lipopolysaccharide in induction of delayed-type hypersensitivity to protein antigens. II. Relationships of intensity of the action to that of other immunological activities. *Immunobiology* **163**:460.
- Orme, I.M. 1988. The immune response to cell wall *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. Immunol.* **71**:388.
- Orme, I.M. 1993. Immunity to mycobacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **5**:497.
- Orme, I.M. & Collins, F.M. 1983. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* **140**:3589.
- Pelletier, M., Forget, A., Bourassa, D., Gros, P. & Skamene, E. 1982. Immunohistopathology study of *Mycobacterium bovis* (BCG) infection in innately resistant and susceptible mice. *J. Immunol.* **129**:2179.
- Pugin, J., Schurer-Maly, C.C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R.J. & Tobias, P.S. 1993. Lipopolysaccharide activation in human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2744.

- Ribeiro, A. S., Arala-Chaves, M. P., Vilanova, M., Porto, M. T., Coutinho, A. 1991. Role of B and T lymphocytes in the specific immunosuppression induced by a protein released by porcine monocytes infected with African Swine Fever Virus. *Int. Immunol.* **3**:165.
- Ribi, E., Larson, C., Wicht, W., List, R. & Goode, G. 1966. Effective on living vaccine against experimental tuberculosis in mice. *J. Bacteriol.* **91**:975.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., di Padova, F., Schreier, M. & Brade, H. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**:271.
- Risso, A., Smilovitch, D., Capra, M.C., Baldissarro, I., Bargallesi, Y.G.A. & Cosulich, M.E. 1991. CD69 in resting and activated lymphocytes. Its association with GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol.* **146**:4105.
- Roitt, I. 1991. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, London.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P. & Haslett, C. 1995. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* **14**:131.
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathinson, J.C., Tobias, P.S. & Ulevitch, R.J. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide-binding protein. *Science* **249**:1429.
- Schwartz, L.M. & Osborne, B.A. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today* **14**:582.
- Seppala, I.J.T. & Makela, O. 1984. Adjuvant action of bacterial LPS and/or alum precipitation in response to polysaccharide and protein antigens. *Immunology* **53**:827.
- Shultz, L.D. & Sidman, C.L. 1987. Genetically-determined murine models of immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* **5**:367.
- Shurr, E., Buschman, E., Malo, D., Gros, P. & Skamene, E. 1990. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J. Infect. Immun.* **161**:634.

- Silva, M.T., Silva, M.N. & Appelberg, R. 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in host defense against mycobacterial infections. *Microbial. Pathogenesis* **6**:700.
- Silverstein, A.M. 1992. A History of Immunology. New York, Academic Press.
- Skamene, E. 1989. Genetic control of susceptibility to mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* **11**:S394.
- Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Kongshavn, P.A.L., Charles, C.S. & Taylor, B.A. 1982. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**:506.
- Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Patel, P.J. & Nesbitt, M. 1984. Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in the mouse. *Immunogenetics* **19**:117.
- Smith, C.A., Farrah, T. & Goodwin, R.G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, coestimulation, and cell death. *Cell* **76**:959.
- Squier, M.K.T., J., S.A. & Cohen, J.J. 1995. Apoptosis in leukocytes. *J. Leukocyte Biol.* **57**:2.
- Steel, D.M. & Whitehead, A.S. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* **15**:81.
- Stone, R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failure. *Science* **264**:365.
- Takada, H. & Kotani, S. 1986. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **16**:477.
- Takada, K., Ohno, N. & Yadomac, T. 1994. Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production *in vivo*. *Infect. Immun.* **62**:1171.
- Tanamoto, K., Zahringer, U., McKenzie, G.R., Galanos, C., Rietschel, E., Luderitz, O., Kusumoto, S. & Shiba, T. 1984. Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infect. Immun.* **44**:421.
- Tavares D., Ferreira, P., Vilanova, M., Videira, A., Arala-Chaves, M. 1995. Immunoprotection against systemic candidiasis in mice. *Int. Immunol.* **7**:785.

- Tavares, D., Salvador, A., Ferreira, P., Arala-Chaves, M. 1993. Immunological activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the survival of the micro-organism in the host. *Infect. Immun.* **61**: 1881.
- Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J. 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.* **37**:269.
- Thorel, M.F. & David, H.L. 1984. Specific surface antigens of Sm T variants of *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* **43**:438.
- Tobias, P., Soldau, K. & Ulevitch, R.J. 1985. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* **164**:777.
- Tobias, P.S., McAdam, K.P.W.J., Soldan, K. & Ulevitch, R.J. 1986. Control of lipopolysaccharide-high-density lipoprotein interactions by an acute-phase reactant in human serum. *Infect. Immun.* **50**:73.
- Tsang, A.Y., Denner, J.C., Brennan, P.J. & McMclatchy, K. 1992. Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complexes isolates. *J. Clin. Microbiol.* **30**:479.
- Uehara, T., Miyawaki, T., Ohta, K., Tamaru, Y., Yokoi, T., Nakamura, S. & Taniguchi, N. 1992. Apoptotic cell death of primed CD45RO⁺ lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* **80**:452.
- Ulevitch, R.J. & Tobias, P.S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:437.
- Vidal, S., Gros, P. & Skamene, E. 1995. Natural resistance to infection with intracellular parasites - molecular genetics identifies *Nramp1* as the *Bcg/Ity/Lsh* locus. *Leukocyte Biol.* **58**:382.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamen, E. & Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* **73**:469.
- von der Mohlen, M.A.M., van der Poll, T., Jansen, J., Levi, M. & van Deventer, S.J.H. 1996. Release of bactericidal/permeability-increasing protein in experimental endotoxin and clinical sepsis. *J. Immunol.* **156**:4969.

- Vilanova, M., Tavares, D., Ferreira, P., Oliveira, L., Nóbrega, A., Appelberg, R., Arala-Chaves, M. 1996. Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens. *Scand. J. Immunol.* **43**:155.
- Wallace, R.J. 1987. Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **1**:67.
- Wang, S.-H., Huang, K.-J., Lin, Y.-S. & Lei, H.-Y. 1994. Sepsis-induced apoptosis in thymocytes in mice. *J. Immunol.* **152**:5014.
- Warren, H.S., Vogel, F.R. & Chedial, L.A. 1986. Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.* **4**:369.
- Webb, S., Morris, C. & Sprent, J. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* **43**: 1249.
- Weiss, A. & Littman, D.R. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**:263.
- Wendt, S.L., George, K.L., Parker, B.C., Gruft, H. & Falkinham, J.O. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *Am. Rev. Respir. Dis.* **122**:259.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, J.M., Farrel, K. & Steller, H. 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila* *Science* **264**:677.
- WHO Technical Report Series, Nº 675, 1982. (Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO Study Group).
- Wolff, S.M. 1991. Monoclonal antibodies and the treatment of Gram-negative bacteremia and shock. *N. Eng. J. Med.* **324**:486.
- Wright, S.D. & Kolesnick, R.N. 1995. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol. Today* **16**:297.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. & Mathison, J.C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**:1431.

- Wyllie, A.H. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**:251.
- Young, D.B., Kaufmann, S.H.E., Hermans, P.W.M. & Thole, J.E.R. 1992. Micobacterial antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.* **6**:133.
- Young, L.S. 1988. AIDS commentary: *Mycobacterium avium* complex infection. *J. Infect. Dis.* **157**:863.
- Zamzani, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B. & Kroemer, G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* **182**:367.
- Zee, K.J., van de Forge, L.E., Fisher, E., Marano, M.A., Kenney, J.S., Remick, D.G., Lowry, S.F. & Moldawer, L.L. 1991. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J. Immunol.* **146**:3478.
- Zhang, M., Gately, M.K., Wang, E., Gong, J., Wolf, S.F., Lu, S., Modlin, R.L. & Barnes, P.F. 1994. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J. Clin. Invest.* **94**:1733.
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F. & Alderson, M.R. 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**:456.
- Zinkernagel, R.M., Moskophidis, D., Kundig, T., Oehen, S., Pircher, H. & Hengartner, H. 1993. Effector T-cell induction and T-cell memory versus peripheral deletion of T cells. *Immunol. Rev.* **15**:162.

5. Conclusões

Os múltiplos ensaios experimentais descritos nos capítulos anteriores desta dissertação permitiram a obtenção de nova informação referente à resposta inespecífica do sistema de defesa à infecção. Saliento de seguida aquelas que me parecem ser as conclusões mais significativas a que o meu trabalho conduziu.

1. A inflamação induzida por um agente flogístico não antigénico, o adjuvante incompleto de Freund, provoca aumento inespecífico de neutrófilos e células mononucleares que está associado a aumento significativo da resistência à infecção por *M. avium* em ratinhos naturalmente susceptíveis (ratinhos BALB/c) a estes parasitas intracelulares. O mesmo fenómeno não ocorre em ratinhos naturalmente resistentes (estirpe C3H) a este agente infeccioso. A actividade antimicobacteriana induzida por inflamação crónica não específica (causada pelo adjuvante incompleto de Freund) é de menor eficácia e de mais curta duração do que o efeito antimicobacteriano produzido por inflamação crónica causada por agente flogístico contendo antígenos micobacterianos (adjuvante completo de Freund). O efeito protector contra a infecção deste segundo tipo de inflamação é dependente da presença de linfócitos T, já que não é observado em murganhos atímicos e representa uma resposta imune adquirida.

2. A diminuição da resposta neutrofílica na inflamação, que resulta da expressão da mutação *lpr* nos ratinhos estirpe MRL, está associada apenas por uma diminuição transitória da resistência deste hospedeiro murino à infecção por *M. avium*, como pude deduzir da comparação da história natural da infecção micobacteriana entre animais da estirpe MRL com ou sem mutação *lpr*.

3. A administração *in vivo* de endotoxina em ratinhos C57BL/6 não só activa as células B maduras (como é conhecido desde a década de sessenta) como também induz a expressão de marcadores de activação leucocitária, tais como CD69 e CD25, em linfócitos T, células estas que apresentam blastização em resultado da injeção de

endotoxina. A expressão *in vivo* do marcador de activação celular CD69 pelos linfócitos B e T de ratinho está dependente da dose de LPS que é injectada nos animais e é um fenómeno de natureza transitória. Em estirpes murinas resistentes ao efeito do LPS sobre os linfócitos B, as células T também não expressam CD69 após exposição *in vivo* à endotoxina.

4. A utilização de ratinhos com "knock-out" (KO) génico permitiu determinar que a activação *in vivo* dos linfócitos T de ratinho pelo LPS não está dependente da presença de linfócitos B (estudo com ratinhos μ KO) ou da expressão de moléculas de MHC de Classe II. A activação dos linfócitos T pelo LPS não é também resultado de efeito directo de TNF- α sobre os linfócitos, nem de fenómenos de choque térmico associados à elevação da temperatura corporal causada pela injeção de endotoxina.

5. A activação *in vivo* de linfócitos T pelo LPS é seguida pela entrada em apoptose da maioria das células T que expressam CD69. Este fenómeno está associado à nossa descoberta de que uma segunda injeção de LPS feita uma semana após a primeira injeção de LPS leva à activação de percentagem baixa de linfócitos T, ou seja apenas das células T que são resultado do "output" tímico que ocorre entre as duas injeções de LPS.

6. Resumos

Resumo

Esta dissertação teve como objectivo estudar experimentalmente no ratinho a participação de mecanismos inespecíficos na resposta do hospedeiro à infecção. Investiguei o papel que a elevação do número de neutrófilos circulantes pode ter na resistência/susceptibilidade inata de ratinhos "inbred" a infecção por *Mycobacterium avium*, assim como estudei o fenómeno de activação policlonal de linfócitos T que é observado no ratinho horas após a injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Os meus resultados experimentais permitiram concluir que o aumento do número de neutrófilos circulantes só tem papel protector do hospedeiro contra infecção por *M. avium* em murganhos que são naturalmente susceptíveis à micobactéria. Este efeito protector é, no entanto, transitório. Na inflamação produzida por antigénios micobacterianos em associação a agente flogístico inespecífico o efeito protector contra infecção por *M. avium* é mais marcado. Em animais MRL/lpr, os quais apresentam deficiência congénita da resposta neutrofílica da inflamação, observei que esta anomalia se traduz apenas por diminuição temporária da resistência natural do hospedeiro à infecção por *M. avium*, decréscimo este que se regista só durante os primeiros meses de infecção. É interessante referir que, sendo o ratinho MRL/lpr modelo animal de doença autoimune espontânea, a infecção micobacteriana atrasa e atenua as alterações patológicas da afecção (semelhante ao lupus) que ocorre nestes animais. Caracterizei a cinética do fenómeno de activação dos linfócitos T do ratinho após a administração intraperitoneal de LPS aos animais. Observei que horas depois da injeção de LPS a maior parte das células T de ratinhos C57BL/6 expressam marcadores de activação celular (CD69 e CD25), a que se segue blastização dos mesmos linfócitos. A utilização de ratinhos com "knock-out" génico permitiu-me excluir alguns dos potenciais mecanismos celulares e moleculares que poderiam estar implicados no fenómeno de activação policlonal de linfócitos T causado pelo LPS. Assim, documentei que este fenómeno não está dependente da presença de linfócitos B, ou da expressão de moléculas da Classe II do MHC. Pude também excluir o efeito directo de TNF- α ou de choque térmico na activação dos linfócitos T causada pelo LPS. Demonstrei que a activação inespecífica pelo LPS de linfócitos T do ratinho conduz secundariamente à morte celular programada destas células por apoptose, o que é expresso por diminuição marcada do número de linfócitos T que é possível activar por segunda injeção dos animais com LPS. Estes dados oferecem a nova informação sobre o efeito agudo do LPS sobre o sistema imunológico do hospedeiro nomeadamente que, para além de activação clássica de linfócitos B, o LPS tem também acção profunda sobre o compartimento T das células do sistema imune. No seu conjunto, os meus resultados reforçam evidência experimental a favor da tese que considera que a activação de mecanismos imunológicos inatos tem potencialmente um papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção.

Abstract

The aim of this thesis was to use in the mouse to study the participation of inespecific mechanisms of host response to infection. I have investigated the effect of increasing the number of circulating neutrophils in the degree of natural susceptibility/resistance of inbred mice to *Mycobacterium avium* infection, I have also characterized the polyclonal T cell activation observed in mice after *in vivo* administration of lipopolyssacharide (LPS) of Gram-negative bacteria. My experimental data allow the conclusions that enhancing the number of circulating neutrophils results in a protective effect against *M. avium* infection only if the host is naturally susceptible to this intracellular parasite. The protective effect is, however, transient. When the inflammation is induced by mycobacterial antigens in association with a phlogistic agent, its protective role against *M. avium* is increased. In MRL/*lpr* mice, that have a congenic disorder in neutrophilic response during inflammation, I found that this disorder of neutrophils is associated with a transient decrease in host natural resistance to *M. avium* infection. It is interesting to point out that MRL/*lpr* are a murine model of spontaneous autoimmune disease and in those animals the mycobacterial infection delays and attenuated the pathological manifestations of the lupus-like disorder that occurs. I have characterized the kinetics of *in vivo* polyclonal T cell activation in mice after intraperitoneal administration of LPS. Most T of the lymphocytes of C57BL/6 mice expressed activation markers (CD69 and CD25) a few hours after LPS injection, a phenomenon that was followed by blastization of the same cells. The use of knock-out mice allowed me to exclude some of the cellular and molecular mechanisms that could be potentially implicated in the massive T cell activation caused by LPS, namely that the event is not dependent on B lymphocytes, or on the expression of MHC Class II molecules. I was also able to exclude that the events is not a direct effect of TNF- α or of heat shock of immune cells caused by LPS. I have also demonstrated that the inespecific polyclonal T cell activation induced by LPS is followed by apoptosis of the same T cells; this is expressed by a marked decrease in the number of T lymphocytes that are activated after a second injection of LPS. My results offer new information on the acute effect of LPS on the immune system of the host, namely by establishing that the addition to the classical B cell activation caused endotoxin, LPS also induces profound changes on the T cell compartment of the immune system. Taken together, this thesis provides new evidence for the view that the activation of innate immunological mechanisms may potentially be of great importance in the modulation of host response to infection.

Résumé

L'objectif de cette thèse a été d'étudier la participation des mécanismes non spécifiques dans la réponse de la défense de l'hôte à l'infection. J'ai étudié le rôle que l'augmentation du nombre de neutrophiles circulants pourrait avoir dans la résistance/susceptibilité innée des souris "inbred" à l'infection par *Mycobacterium avium*. J'ai aussi étudié le phénomène de l'activation polyclonale chez la souris quelques heures après l'infection intraperitoneale par le lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives. Mes résultats expérimentaux m'ont permis de conclure que l'augmentation du nombre de neutrophiles circulants a un rôle uniquement protecteur de l'hôte contre l'infection par *M. avium* chez les souris naturellement susceptibles à cette mycobactérie. Cet effet protecteur est pourtant transitoire. Chez les souris MRL/lpr qui présentent une anomalie congénique de la réponse neutrophilique induite par l'inflammation, j'ai observé que cette anomalie se traduisait uniquement par une diminution temporaire de la résistance naturelle de l'hôte vis à vis de l'infection par *M. avium*, cette diminution s'observe seulement pendant les premiers mois d'infection. Il est intéressant de mentionner, que dans le modèle spontané de la maladie auto-immune, les infections mycobactériennes retardent et atténuent les symptômes pathologiques qui ressemblent au lupus. J'ai caractérisé la cinétique de l'activation polyclonale des lymphocytes T chez les souris après l'injection intrapéritoneale du LPS. Quelques heures après l'injection du LPS, la plupart des lymphocytes T des souris C57BL/6 exprimaient des marqueurs d'activation cellulaire (CD69 et CD25) suivis de la blastisation des mêmes lymphocytes. L'utilisation des souris "knock out" m'a permis d'exclure certains mécanismes cellulaires et moléculaires que devraient être impliqués dans le phénomène d'activation polyclonale des lymphocytes T provoquée par le LPS. J'ai démontré que ce phénomène n'est pas dépendant de la présence des lymphocytes B, ou de l'expression de molécules de MHC classe II. J'ai pu aussi exclure l'effet direct du TNF- α , ou du choc thermique dans l'activation des lymphocytes T provoquée par le LPS. J'ai démontré que l'activation non spécifique des lymphocytes T de la souris par le LPS conduit secondairement à la mort cellulaire programmée de ces cellules par apoptose; ceci se traduit par la diminution significative du nombre de lymphocytes T qu'il est possible d'activer par une seconde injection des animaux avec LPS. Ces résultats apportent une nouvelle information sur l'effet aigu du LPS sur le système immunitaire de l'hôte: le LPS n'a pas uniquement un effet sur l'activation classique des lymphocytes B, mais aussi une action importante sur le compartiment T des cellules du système immunitaire. L'ensemble de mes résultats renforcent les données expérimentales favorisant la théorie qui considère que l'activation des mécanismes immunes innés ont un rôle fondamental dans la réponse de l'hôte à l'infection.

07/11/18 97 11 18
2.500\$00

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
"ABEL SALAZAR"