

**Centro de Citologia Experimental  
da Universidade do Porto**

**Amélia Maria Marques da Silva Rodrigues Sarmento**

**Papel do macrófago na expressão de resistência ou  
susceptibilidade à infecção por *Mycobacterium avium* no ratinho.**

**PORTO, 1996**



**Centro de Citologia Experimental  
da Universidade do Porto**

**Amélia Maria Marques da Silva Rodrigues Sarmento**

**Papel do macrófago na expressão de resistência ou  
susceptibilidade à infecção por *Mycobacterium avium* no ratinho.**

**PORTO, 1996**

7209

PORTO, 1996

**Papel do macrófago na expressão de resistência ou susceptibilidade à infecção por *Mycobacterium avium* no ratinho.**

**Amélia Maria Marques da Silva Rodrigues Sarmento**

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

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

A presente dissertação foi preparada no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, com o apoio financeiro da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, nomeadamente através das bolsas de Doutoramento BD/908/90 e BD/2846/94, dos Programas Ciência e Praxis XXI, respectivamente.

## Declaração

De acordo com o disposto no nº 2 do artigo 8º do Decreto Lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados das publicações abaixo indicadas. No cumprimento do disposto no referido Decreto Lei, o autor desta dissertação declara que interveio na concepção e na execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados.

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. 80:324-331.

Appelberg,R., Sarmiento,A., Castro, A.G. 1995. Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence. Clin.Exp.Immunol. 101:308-313.

Sarmiento,A.M., Appelberg,R. 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in *in vitro* -cultured mouse macrophages. Infect.Immun. 63:3759-3764.

Sarmiento,A., Appelberg,R. 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in the tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. Infect.Immun. in press.

**Ao António,**

**ao nosso filho,**

**e a todos os que tornaram possível a realização deste trabalho**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos os que tornaram possível este trabalho:

- Ao Doutor Manuel T. Silva, pela oportunidade que me deu de trabalhar no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Centro de Citologia Experimental, pelo exemplo que constitui a sua forma de viver a Ciência, por toda a orientação científica e por todo o apoio e amizade ao longo destes anos.

- Ao Professor Rui Appelberg, pelo decisivo apoio demonstrado na orientação científica e na aprendizagem experimental deste trabalho, por tantas vezes me ter incentivado a progredir, e pela amizade constante ao longo de todo o meu percurso no Departamento.

- Aos Drs. Jorge Pedrosa e António G. Castro, pela colaboração científica e humana, e por todo o companheirismo, sem os quais se tornaria difícil a concretização deste trabalho.

- À Paula Macedo, à Dra. Nair Esaguy e ao Professor Artur Àguas, pela amizade e apoio demonstrados.

- Ao Professor Alexandre Quintanilha, e por ele, também ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da U.P., pela possibilidade de realizar o meu Doutoramento nesse Instituto.

À minha família e a todos os que, de forma directa ou indirecta contribuíram para a minha formação científica e sempre me incentivaram a progredir, o meu Muito Obrigado.



## ABREVIATURAS

Optou-se, na maioria dos casos, por manter as abreviaturas dos termos em língua Inglesa dado a maioria destas ter já uma expansão que lhes permite serem facilmente identificáveis.

ATP	- ("adenosine triphosphate") trifosfato de adenosina
APC	- ("antigen presenting cell") célula apresentadora de antigénio
BMMØ	- ("bone marrow-derived macrophages") macrófagos derivados da medula óssea
CR	- ("complement receptor") receptor do complemento
CSF	- ("colony-stimulating factor") factor estimulador de colónias
G-CSF	- ("granulocyte colony-stimulating factor") factor estimulador de colónias granulocíticas
GM-CSF	- ("granulocyte-macophage colony-stimulating factor") factor estimulador de colónias granulocíticas-macrofágicas
GPL	- ("glycopeptidolipid") glicopeptidolípido
IFN- $\gamma$	- ("interferon-gamma") interferão-gama
Ig	- imunoglobulina
IL	- ("interleukin") interleucina
LAM	- ("lipoarabinomannan") lipoarabinomanano
LPS	- ("lipopolysaccharide") lipopolissacarídeo
MAC	- (" <i>Mycobacterium avium</i> complex") complexo <i>Mycobacterium avium</i>
M-CSF	- ("macrophage colony-stimulating factor") factor estimulador de colónias macrofágicas
MDT	- ("multidrug therapy") terapia com múltiplas drogas
MHC	- ("major histocompatibility complex") complexo maior de histocompatibilidade
MIP	- ("macrophage inflammatory protein") proteína inflamatória do macrófago
MPO	- ("myeloperoxidase") mieloperoxidase

NADPH	- ("nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-reduced") nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NK	- ("natural killer") [célula] matadora natural
Nramp	- ("natural resistance associated membrane protein") proteína de membrana associada à resistência natural
ONS	- óxido nítrico sintetase
PGE	- ("prostaglandin") prostaglandina
PGL	- ("phenolic glycolipid") glicolípido fenólico
PMA	- ("phorbol myristate acetate") acetato mirístico de forbol
Rg	- ("rough") rugosa
RNI	- ("reactive nitrogen intermediates") radicais de azoto
ROI	- ("reactive oxygen intermediates") radicais de oxigénio
RPMØ	- ("resident peritoneal macrophages") macrófagos residentes peritoneais
SCID	- ("severe combined immunodeficiency") imunodeficiência severa combinada
SIDA	- síndrome de imunodeficiência adquirida
SmOp	- ("smooth opaque") lisa opaca
SmTr	- ("smooth transparent") lisa transparente
SOD	- ("superoxide dismutase") superóxido dismutase
TCR	- ("T cell receptor") receptor da célula T
TGF-β	- ("transforming growth factor-beta") factor de crescimento transformador-beta
TNF-α	- ("tumor necrosis factor-alpha") factor de necrose tumoral alfa

# ÍNDICE

RESUMO	1
SUMMARY	5
RESUMÉ	9
INTRODUÇÃO	13
<b>1. <u>Epidemiologia e patologia das micobacterioses</u></b>	13
<b>1.1. Género <i>Mycobacterium</i></b>	13
<b>1.2. <i>Mycobacterium avium</i></b>	17
<b>2. <u>Aspectos estruturais e fisiológicos das micobactérias</u></b>	20
<b>3. <u>Interacção micobactéria-hospedeiro</u></b>	23
<b>3.1. Primeira linha de defesa do hospedeiro à infecção:</b>	
barreiras naturais	23
<b>3.2. Variabilidade na virulência das estirpes de <i>M. avium</i></b>	23
<b>3.3. Resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção</b>	
por <i>M. avium</i>	25
<b>3.4. O macrófago</b>	27
a) Mielopoiese e diferenciação	28
b) Heterogeneidade	29
c) Interacção micobactéria-macrófago	31
<b>3.5. As citocinas na infecção por <i>M. avium</i></b>	45
a) Factor de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )	46
b) Interferão-gama (IFN- $\gamma$ )	49
c) Outras citocinas	53
<b>3.6. Participação de granulócitos neutrófilos, células NK e</b>	
linfócitos na resposta do hospedeiro à infecção por <i>M. avium</i>	60

<b>3.6.1. O neutrófilo</b>	61
<b>3.6.2. A célula "Natural Killer" (NK)</b>	62
<b>3.6.3. O linfócito B</b>	64
<b>3.6.4. O linfócito T</b>	65

<b>OBJECTIVOS</b>	71
-------------------	----

<b>TRABALHO EXPERIMENTAL</b>	72
------------------------------	----

1. 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. 80:324-331.

2. Appelberg,R., Sarmiento,A., Castro, A.G. 1995. Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence. Clin.Exp.Immunol. 101:308-313.

3. Sarmiento,A.M., Appelberg,R. 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in *in vitro* -cultured mouse macrophages. Infect.Immun. 63:3759-3764.

4. Sarmiento,A., Appelberg,R. 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in the tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. Infect.Immun. in press.

<b>DISCUSSÃO</b>	129
------------------	-----

<b>REFERÊNCIAS</b>	139
--------------------	-----

## RESUMO

O *Mycobacterium avium* é uma micobactéria de importância crescente nos nossos dias, uma vez que tem-se vindo a verificar um aumento significativo do número de casos de infecção por este agente microbiano, associado ao aumento do número de casos de SIDA. É, assim, de importância fundamental o conhecimento dos mecanismos microbianos e do hospedeiro envolvidos na infecção, para que medidas eficazes para o combate a essa infecção possam ser desenvolvidas.

Sendo o *M. avium* um parasita intracelular, no organismo do hospedeiro é no interior do macrófago que a bactéria vai proliferar ou vai ter o seu crescimento controlado. O macrófago possui mecanismos que, ao serem despoletados, podem contribuir para que a proliferação bacilar seja impedida. A virulência da micobactéria vai depender da sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se no ambiente hostil com que vai deparar no interior dos macrófagos.

O principal objectivo do presente trabalho consistiu em analisar alguns aspectos da interacção *M. avium*/macrófago, na tentativa de identificar mecanismos de virulência da micobactéria e, também, mecanismos macrofágicos relacionados com a resistência inata do hospedeiro a esta infecção.

Primeiramente foram avaliadas as bases da resistência inata do ratinho, dividindo sete estirpes murinas em dois grupos, com base na sua resistência à infecção por *M. avium*. As quatro estirpes susceptíveis estudadas expressavam o alelo *Bcg<sup>S</sup>*, e as três resistentes, o alelo *Bcg<sup>F</sup>*. Confirmou-se que o gene *Bcg* é o principal determinante da resistência contra *M. avium* na infecção murina, através do estudo da infecção em ratinhos congénicos BALB/c (*Bcg<sup>S</sup>*) e BALB/c.*Bcg<sup>F</sup>* (C.D2). A presença do segmento do cromossoma 1 contendo o gene *Bcg<sup>F</sup>* tornou os ratinhos BALB/c resistentes à infecção. A capacidade inata dos ratinhos C.D2 para restringir o crescimento de *M. avium* demonstrou ser independente do TNF- $\alpha$ , uma vez

que a neutralização desta citocina não afectou o crescimento bacteriano nestes ratinhos. Não foram encontradas diferenças no nível de resistência não-específica contra *Listeria* entre ratinhos *Bcg<sup>S</sup>* e *Bcg<sup>r</sup>*, nem de produção de nitritos entre macrófagos peritoneais de ratinhos *Bcg<sup>S</sup>* e *Bcg<sup>r</sup>* infectados por *M. avium*; por outro lado a produção de peróxido de hidrogénio por macrófagos peritoneais aos 30 dias de infecção intraperitoneal por *M. avium* foi superior nos ratinhos *Bcg<sup>S</sup>* comparativamente aos ratinhos *Bcg<sup>r</sup>*. Estas observações sugeriram a existência de um defeito no macrófago *Bcg<sup>S</sup>* que impediria o controlo da infecção por *M. avium*, defeito que seria independente da produção de peróxido de hidrogénio (ou de radicais de oxigénio), dos factores que controlam o crescimento de *Listeria*, e da produção de nitritos.

Uma vez que tem sido sugerido por vários autores que a capacidade de indução pela micobactéria infectante da produção de TNF- $\alpha$  no macrófago poderá constituir um importante factor de virulência, foram estudados dois morfotipos coloniais da estirpe *M. avium* 2.151 (SmTr e SmOp), que exibem marcadas diferenças de virulência, quanto à capacidade de induzir a produção de TNF- $\alpha$  em ratinhos e culturas de macrófagos murinos derivados da medula óssea. Tanto em ratinhos como em macrófagos isolados, o morfotipo SmTr apresentou grande proliferação, enquanto que o morfotipo SmOp não proliferou. *In vitro*, nenhuma das estirpes foi capaz de induzir TNF- $\alpha$  e a neutralização de TNF- $\alpha$  não teve qualquer efeito no crescimento de ambos os morfotipos. *In vivo*, o morfotipo SmTr foi capaz de induzir melhor "priming" para a produção de TNF- $\alpha$  do que o morfotipo SmOp, e a proliferação daquele morfotipo aumentou após neutralização de TNF- $\alpha$ , passadas as duas primeiras semanas de infecção em ratinhos BALB/c. Estes resultados sugerem que após a resposta imune desenvolvida na infecção pelo morfotipo SmTr, pode ter sido aumentada a produção de TNF- $\alpha$ , e assim esta molécula ter desempenhado um papel na restrição do crescimento desse morfotipo. Pode-se também concluir dos resultados que a não virulência da variante SmOp não se deve à capacidade desta variante estimular a secreção de TNF- $\alpha$ , mas sim, provavelmente, ao facto deste morfotipo ser susceptível aos mecanismos anti-microbianos expressos constitutivamente no macrófago, sem necessitarem de activação.

Foi também estudada a capacidade de indução de produção de TNF- $\alpha$  e os efeitos da sua neutralização *in vivo* e *in vitro* na infecção por duas outras estirpes de *M. avium* diferindo na virulência: as estirpes 25291 e 1983. A estirpe 1983, de baixa virulência, induziu elevada produção de TNF- $\alpha$ , enquanto que a estirpe 25291, de alta virulência, induziu baixa produção desta molécula em macrófagos residentes peritoneais infectados *in vitro*. A neutralização do TNF- $\alpha$  *in vitro* permitiu que a estirpe 1983 proliferasse em níveis semelhantes aos observados para a estirpe 25291. *In vivo*, em ratinhos BALB/c, a neutralização de TNF- $\alpha$  durante a infecção por 1983 impediu a eliminação bacteriana no fígado e a bacteriostase no baço, sugerindo a existência de uma actividade anti-micobacteriana TNF- $\alpha$ -dependente contra a estirpe 1983, nestes órgãos. A neutralização do TNF- $\alpha$  em ratinhos BALB/c infectados com a estirpe de alta virulência demonstrou apenas um efeito tardio no seu crescimento, quando a estimulação do macrófago para a produção de TNF- $\alpha$  por mediadores da resposta imune (como, por exemplo, IFN- $\gamma$ ) teria, com certeza, ocorrido. Assim, destes resultados pode-se concluir que a baixa virulência da estirpe 1983 *in vitro* é dependente da indução, pela micobactéria, da secreção de TNF- $\alpha$ , e do efeito desta molécula nos macrófagos residentes peritoneais; esse efeito pode ser autócrino ou parácrino uma vez que esta citocina pode actuar quer na célula que a produziu, quer nas células circundantes. Nos ratinhos BALB/c, o controlo do crescimento de 1983 será, pelo menos em parte, dependente da presença de TNF- $\alpha$ , cuja produção poderá ser induzida pela própria bactéria, de maneira análoga ao observado *in vitro*.

De seguida, interessou-nos estudar que mecanismo(s) anti-microbiano(s) do macrófago estaria(m) envolvido(s) na bacteriostase da estirpe 1983, dependente do TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  induzido pela estirpe 1983 nos macrófagos estimulou a produção de superóxido de modo autócrino/parácrino. Por outro lado, a estirpe 25291, fraca indutora da síntese de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, induziu baixos níveis de secreção de superóxido. A adição de catalase aos macrófagos infectados com *M. avium* 1983 mostrou que esta estirpe é susceptível ao peróxido de hidrogénio produzido pelo fagocito. Pôde-se, assim, concluir destes resultados

que a estirpe 1983, de baixa virulência, induziu a produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos, o qual actuou como um forte estimulador para a produção de radicais de oxigénio por estas células. Esta estirpe demonstrou ser susceptível à acção do peróxido de hidrogénio produzido por aqueles fagocitos, sendo assim explicada a restrição do seu crescimento.

Em resumo, mostrámos que o gene *Bcg* desempenha um papel fundamental na resistência à infecção por *M. avium* no ratinho, confirmando resultados referidos na literatura. Esse papel demonstrou ser independente da presença de TNF- $\alpha$  e dependente de uma função macrofágica. Enquanto que a diferença da virulência entre os morfotipos SmTr e SmOp da estirpe 2.151 parece depender do facto do morfotipo SmOp ser susceptível aos mecanismos anti-micobacterianos expressos constitutivamente no macrófago, a diferença de virulência entre duas outras estirpes de *M. avium* (as estirpes 25291 e 1983, ambas SmTr), é dependente da capacidade de indução da produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos, o qual vai actuar autócrina ou paracrinamente, tornando o macrófago mais activado nos seus mecanismos anti-micobacterianos.



## SUMMARY

*Mycobacterium avium* is an intracellular pathogen of emerging importance in human disease, generally associated with AIDS cases. It is of fundamental importance to increase our knowledge of microbial and host mechanisms involved in this infection, so that efficient ways to attack it can be developed.

As an intracellular pathogen, *M. avium*, when it enters a host, resides mainly inside the macrophage, which will permit or restrain bacterial growth. As the macrophage is equipped with antimicrobial mechanisms, mycobacterial virulence will depend on its capacity to survive and multiply in the hostile environment which will be found inside macrophages.

The main purpose of the present work was to study several aspects of *M. avium* /macrophage interaction in an attempt to identify virulence mechanisms of the pathogen as well as macrophage mechanisms responsible for the innate resistance of the host to this infection.

First, we evaluated the basis of mice innate resistance, using mice that could be separated into two groups, based on their resistance to *M. avium* infection. The four susceptible strains studied expressed the *Bcg<sup>S</sup>* allele, and the three resistant strains expressed the *Bcg<sup>F</sup>* allele. Data obtained after the infection of the congenic strains BALB/c (*Bcg<sup>S</sup>*) and BALB/c.*Bcg<sup>F</sup>* (C.D2) confirmed that the *Bcg* gene is the main determinant of resistance against *M. avium* mouse infection. The presence of chromosome 1 segment containing the allele *Bcg<sup>F</sup>* conferred resistance to the susceptible BALB/c mice. The innate ability of C.D2 mice to restrain *M. avium* growth was shown to be independent of TNF- $\alpha$ , according to data obtained in cytokine neutralization experiments. We found no differences in non-specific *Listeria* resistance or nitrite production between *Bcg<sup>S</sup>* and *Bcg<sup>F</sup>* *M. avium*-infected mice; on the other hand, hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages at day 30 of intraperitoneal infection was higher in *Bcg<sup>S</sup>* mice as compared to *Bcg<sup>F</sup>* mice. These observations suggested the existence of a defect in the *Bcg<sup>S</sup>* macrophage, different from

oxygen radical or nitrite production, and not involved in the control of *Listeria* growth, rendering that macrophage susceptible to *M. avium* infection.

It has been suggested that the induction of TNF- $\alpha$  production in the macrophage by the infecting mycobacteria is an important bacterial virulence factor. We then tested two colonial morphotypes of *M. avium* 2.151 (SmTr and SmOp), exhibiting marked differences in virulence, in their capacity to induce TNF- $\alpha$  production in mice and in mouse bone marrow-derived macrophages. The SmTr morphotype proliferated to a great extent both in mice and in cultured macrophages; on the contrary, the SmOp variant was not able to proliferate. None of the morphotypes tested induced TNF- $\alpha$  production *in vitro*, and neutralization of this cytokine had no effect on the growth of both morphotypes. However, the SmTr variant was a better *in vivo* priming agent for TNF- $\alpha$  production than the SmOp and neutralization of this cytokine caused an increase in proliferation of the SmTr morphotype after the first two weeks of infection in BALB/c mice. These results suggest that the immune response developed by mice infected with the SmTr morphotype probably led to increased TNF- $\alpha$  production, which in turn could play a role in controlling to some extent the growth of this morphotype. We can also conclude from these results that the basis of the lack of virulence of the SmOp variant does not relate to the induction of TNF- $\alpha$  production but may rather depend on the innate susceptibility of this morphotype to antimicrobial mechanisms of the macrophage expressed constitutively with no need for activation by cytokines.

We also studied two other *M. avium* strains differing in virulence for mice (strains 25291 and 1983) in their capacity of inducing TNF- $\alpha$  production and the effects of TNF- $\alpha$  neutralization in *in vivo* and *in vitro* infection by these strains. *M. avium* 1983, a low virulence strain, induced high levels of TNF- $\alpha$  and strain 25291, a highly virulent strain, induced production of low levels of this cytokine by resident peritoneal macrophages infected *in vitro*. *In vitro* neutralization of TNF- $\alpha$  enhanced the growth of strain 1983 to an extent similar to that of strain 25291, but had no effect on the growth of the latter strain. *In vivo*,

TNF- $\alpha$  neutralization in BALB/c mice infected with *M. avium* 1983 abrogated bacterial clearance in the liver and bacteriostasis in the spleen, suggesting the existence of a TNF- $\alpha$ -dependent antimycobacterial activity against strain 1983 in those organs. Neutralization of TNF- $\alpha$  in BALB/c mice infected with the highly virulent strain showed minor effects on its growth, effects which were observed later in infection, when macrophage priming for TNF- $\alpha$  secretion is expected to have occurred. These data suggest that the low virulence of 1983 strain observed *in vitro* is dependent on the induction, by the mycobacteria, of TNF- $\alpha$  secretion and on the effect of this molecule on resident peritoneal macrophages; such an effect could be autocrine or paracrine, because TNF- $\alpha$  can activate both the producer cell and the cells around it. In BALB/c mice the growth of 1983 strain is, at least partly, dependent on the presence of TNF- $\alpha$ ; the production of this cytokine can be induced by strain 1983, as observed *in vitro*.

Next, we were interested in studying the macrophage antimicrobial mechanism(s) involved in the TNF- $\alpha$  dependent bacteriostasis of strain 1983. TNF- $\alpha$  induced by strain 1983 in macrophages autocrinally/paracrinally stimulated the production of superoxide by these cells. On the other hand, strain 25291, a weak inducer of TNF- $\alpha$  secretion by the macrophages, induced low levels of superoxide secretion. Catalase addition to the macrophages infected with *M. avium* 1983 revealed this strain to be susceptible to the hydrogen peroxide produced by the phagocyte. These results suggest that *M. avium* 1983, a low virulence strain, induced TNF- $\alpha$  production in the macrophages, which acted by stimulating reactive oxygen radical production by these cells. This strain was susceptible to the hydrogen peroxide produced by those phagocytes, and thus its growth was restricted.

In summary, we showed that the *Bcg* gene plays an important role in the resistance of mice to *M. avium* infection, confirming previous results. This role is independent of TNF- $\alpha$  and dependent on a macrophage function. The difference in virulence observed between SmTr and SmOp morphotypes of *M. avium* 2.151 seems to depend on the fact that SmOp variant is susceptible to the anti-mycobacterial mechanisms constitutively expressed by

the macrophage; on the other hand, the difference in virulence observed between two other *M. avium* strains (25291 and 1983 strains), both from SmTr colonial morphotype, is dependent on the capacity of induction of TNF- $\alpha$  secretion by macrophages, which will play a role in activating the anti-mycobacterial mechanisms of these cells

## RESUMÉ

Le *Mycobacterium avium* est une mycobactérie d'importance croissante à nos jours, car une augmentation significative du nombre de cas d'infection par cet agent microbien se trouve associée à l'augmentation du nombre de cas de SIDA. C'est pourquoi la connaissance des mécanismes microbiens et du hôte impliqués dans l'infection, est d'importance fondamentale pour le développement de mesures efficaces de lutte contre l'infection.

Vu que *M. avium* est un parasite intracellulaire, dans l'organisme du hôte, c'est à l'intérieur du macrophage que la bactérie va proliférer ou avoir sa croissance contrôlée. Le macrophage possède des mécanismes qui, une fois activés, peuvent contribuer à l'empêchement de la prolifération bacillaire. La virulence de la mycobactérie dépend de sa capacité de survivre et de se multiplier dans un milieu hostile, comme celui des macrophages.

L'objectif principal de ce travail a été l'analyse de quelques aspects de l'interaction *M. avium*/macrophage qui permettraient de comprendre les mécanismes de virulence de la mycobactérie et de la résistance innée liée aux macrophages du hôte.

Premièrement on a évalué les mécanismes de résistance innée de souris, en répartissant sept lignées murines en deux groupes, en fonction de leur résistance à l'infection par *M. avium*. Les quatre lignées susceptibles étudiées exprimaient l'allèle *Bcg<sup>S</sup>* et les trois résistantes, l'allèle *Bcg<sup>R</sup>*. On a confirmé à partir de l'étude de l'infection des souris congénères BALB/c (*Bcg<sup>S</sup>*) et BALB/c.*Bcg<sup>R</sup>* (C.D2), que le gène *Bcg* est le gène le plus important dans la détermination de la résistance contre *M. avium* à l'infection murine. A cause de la présence du segment du chromosome 1, qui contient le gène *Bcg<sup>R</sup>*, les souris ont développé une résistance à l'infection. La capacité innée des souris C.D2 de restreindre la croissance de *M. avium* s'est révélée indépendante du TNF- $\alpha$ , vu que la neutralisation de cette cytokine n'a pas affecté la croissance bactérienne dans ces souris. On n'a trouvé ni de différences au niveau de la résistance non spécifique contre *Listeria* entre les souris *Bcg<sup>S</sup>* et *Bcg<sup>R</sup>*, ni de production de nitrite entre macrophages péritonéaux des souris *Bcg<sup>S</sup>* et *Bcg<sup>R</sup>*.

infectés de *M. avium*; par contre, la production de peroxyde d'hydrogène par des macrophages péritonéaux après 30 jours d'infection intrapéritoneale par *M. avium* a été supérieure dans les souris *Bcg<sup>S</sup>* en comparaison avec les souris *Bcg<sup>T</sup>*. Ces observations ont suggéré l'existence d'un défaut dans le macrophage *Bcg<sup>S</sup>* qui empêcherait le contrôle de l'infection par *M. avium*. Ce défaut serait indépendant de la production du peroxyde d'hydrogène (ou des radicaux d'oxygène), des facteurs qui contrôlent la croissance de *Listeria* et de la production de nitrites.

Certains auteurs ont suggéré que la production du TNF- $\alpha$  par les macrophages en réponse à l'infection par la mycobactérie pourrait constituer un facteur important de virulence. On a alors étudié deux morphotypes coloniaux de la lignée *M. avium* 2.151 (SmTr et SmOp), qui montrent des différences notoires de virulence, dans la capacité d'induire la production de TNF- $\alpha$  dans des souris et cultures de macrophages murins dérivés de la moelle osseuse. Dans les deux cas, le morphotype SmTr a présenté une grande prolifération, alors que le morphotype SmOp n'a pas proliféré. *In vitro*, aucune des lignées n'a été capable d'induire le TNF- $\alpha$  et la neutralisation de TNF- $\alpha$  n'a eu aucun effet sur la croissance des deux morphotypes. *In vivo*, le morphotype SmTr a été capable d'induire un meilleur "priming" dans la production de TNF- $\alpha$  que le morphotype SmOp et la prolifération de ce morphotype-là a augmenté après la neutralisation de TNF- $\alpha$ , deux semaines après l'infection des souris BALB/c. Les résultats suggèrent qu'après la réponse immunitaire développée suite à l'infection par le morphotype SmTr, la production de TNF- $\alpha$  aurait augmenté et cette augmentation aurait limité la croissance de ce morphotype. On peut aussi conclure à partir des résultats, que la non virulence de la variante SmOp n'est pas due à la capacité de cette variante à stimuler la sécrétion de TNF- $\alpha$  mais, probablement, au fait de la susceptibilité de ce morphotype aux mécanismes anti-microbiens d'expression constitutive dans le macrophage.

On a aussi étudié la capacité d'induction de la production de TNF- $\alpha$  et les effets de sa neutralisation *in vivo* et *in vitro* dans l'infection par deux autres lignées de *M. avium* différentes en ce qui concerne la virulence: les lignées 25291 et 1983. La lignée 1983, de

basse virulence, a induit une production élevée de TNF- $\alpha$ , pendant que la lignée 25291, de haute virulence, a induit une basse production de cette molécule par les macrophages péritoneaux résidents infectés *in vitro*. La neutralisation du TNF- $\alpha$  *in vitro* a permis la prolifération de la lignée 1983 à des niveaux semblables à ceux qui ont été observés dans la lignée 25291. *In vivo*, dans des souris BALB/c, la neutralisation de TNF- $\alpha$  pendant l'infection par la lignée 1983 a empêché l'élimination bactérienne dans le foie et la bactériostase dans la rate, suggérant l'existence d'une activité anti-mycobactérienne TNF- $\alpha$ -dépendante contre la lignée 1983, dans ces organes. La neutralisation du TNF- $\alpha$  dans des souris infectés par la lignée de haute virulence a seulement démontré un effet tardif sur sa croissance, au moment où la stimulation du macrophage à produire le TNF- $\alpha$  par les médiateurs de la réponse immune (comme, par exemple, IFN- $\gamma$ ) aurait, certainement, eu lieu. Ainsi, à partir de ces résultats on peut conclure que la faible virulence de la lignée 1983 *in vitro* est dépendante de l'induction, par la mycobactérie, de la sécrétion par le macrophage du TNF- $\alpha$ , et de l'effet de cette molécule dans les macrophages péritoneaux résident; cet effet pourrait être autocrine ou paracrine, une fois que cette molécule peut agir soit dans la cellule qui l'a produite, soit dans les cellules circonvenantes. Dans les souris BALB/c, le contrôle de la croissance de la lignée 1983 serait, au moins partiellement, dépendant de la présence de TNF- $\alpha$ , dont la production pourrait être induite par la bactérie elle même, de façon analogue à ce qu'on observe *in vitro*.

Ensuite, on a voulu étudier le ou les mécanisme(s) anti-microbien(s) du macrophage qui seraient impliqués dans la bactériostase de la lignée 1983, dépendante du TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  induit par la lignée 1983 dans les macrophages a stimulé la production de superoxyde de façon autocrine/paracrine. Par contre, la lignée 25291, faible inductrice de la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages, a induit un niveau bas de sécrétion de superoxyde. L'addition de catalase aux macrophages infectés par *M. avium* 1983 a montré que cette lignée est sensible au peroxyde d'hydrogène produit par le phagocyte. On peut, ainsi, conclure, à partir de ces résultats, que la lignée 1983, de basse virulence, a induit la production de TNF- $\alpha$  par

les macrophages, lequel a agit comme un stimulateur puissant de la production de radicaux d'oxygène par ces cellules. Cette lignée a démontré sa susceptibilité à l'action du peroxyde d'hydrogène produit par les phagocytes, et la restriction de sa croissance est ainsi expliquée.

En résumé, on a montré que le gène *Bcg* joue un rôle fondamental dans la résistance à l'infection par *M. avium* chez la souris, confirmant des résultats cités dans la littérature. Ce rôle est indépendant de la présence du TNF- $\alpha$  et dépendant de la fonction macrophagique. Alors que la différence de la virulence entre les morphotypes SmTr et SmOp de la lignée 2.151 semble dépendre de la susceptibilité du morphotype SmOp aux mécanismes anti-mycobactériennes d'expression constitutive dans le macrophage, la différence de virulence entre deux autres lignées de *M. avium* (les lignées 25291 et 1983, les deux SmTr), est dépendante de la capacité d'induction de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages, lequel va agir par voie autocrine ou paracrine, rendant le macrophage encore plus activé dans ses mécanismes anti-mycobactériennes.



## INTRODUÇÃO

### 1. Epidemiologia e patologia das micobacterioses

#### 1.1. Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é constituído por mais de 50 espécies, incluindo as causadoras das micobacterioses mais comuns no homem: *Mycobacterium tuberculosis*, agente da tuberculose e *M. leprae*, agente da lepra. Embora estas duas espécies sejam parasitas intracelulares obrigatórios, e sobrevivam apenas no interior das células do hospedeiro, a maioria das micobactérias vivem livremente no ambiente, particularmente em locais húmidos como pântanos, estuários, rios e canalizações de água. Algumas destas espécies ambientais podem também causar doença nos animais e no homem (Grange e Yates, 1986; Collins, 1988; Wolinsky, 1992).

Sob o ponto de vista clínico, as micobactérias dividem-se em três grupos (Grange e Yates, 1986):

A. Espécies ambientais saprófitas (nunca, ou raramente, causam doença).

Das micobactérias incluídas neste grupo podemos referir: *M. smegmatis*, *M. gastri*, *M. flavescens*, complexo *M. terrae* (compreende as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*, encontrando-se no solo (Wayne, 1985)) e *M. goodii* (que se encontra em abundância no ambiente (Wolinsky, 1992; Good, 1985). Estão, no entanto, descritos alguns casos de infecção provocados por micobactérias deste grupo (Wolinsky, 1979; Wayne, 1985; Collins, 1988).

## B. Espécies ambientais causadoras de doença (micobactérias ditas "atípicas").

Enquanto que *M. kansasii* e *M. ulcerans* podem causar doença em adultos normais, a maioria das outras micobactérias incluídas neste grupo induz infecção sistémica apenas quando existem condições no hospedeiro que predis põem à infecção):

- *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, causam doenças da pele.

- *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*, provocam lesões semelhantes à tuberculose (Grange e Yates, 1986; Wolinsky, 1992; Wayne, 1985).

Na maioria dos casos existe um factor no hospedeiro que predis põe à infecção pulmonar, embora mais raramente também sejam infectados indivíduos aparentemente sãos. Estas micobactérias podem também causar doença não pulmonar, semelhante à provocada por *M. tuberculosis*, tal como lesões nos ossos, tracto urinário, sistema nervoso central, gânglios linfáticos, pele, e em muitos outros sistemas e órgãos (Grange e Yates, 1986; Wolinsky, 1992).

As micobactérias atípicas são, por vezes responsáveis pelo aparecimento de doença disseminada, com bacilos colonizando quase todo o organismo. Neste caso, a resposta imune protectora à infecção é praticamente nula. A infecção disseminada ocorre geralmente associada a uma situação de imunodeficiência congénita ou adquirida, como a resultante da terapêutica imunossupressora após transplante, e como a existente nos doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, e *M. kansasii* são as espécies causadoras da maioria dos casos de infecção disseminada (Grange e Yates, 1986; Wolinsky, 1992).

C. Agentes da tuberculose (incluindo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), e da lepra (*M. leprae*).

Os agentes da tuberculose no homem, causam uma doença muito grave. O órgão mais vulgarmente afectado é o pulmão, embora possa também afectar qualquer outra parte do corpo. O contágio ocorre quase exclusivamente pelo ar respirado: a inalação de gotículas emitidas pela tosse de doentes pode conduzir à infecção por *M. tuberculosis*. A amplitude do "reservatório" (população infectada) é bastante variável em diferentes zonas do mundo: de cerca de 7% nos Estados Unidos até a quase totalidade da população adulta em alguns países da Ásia, África e América do Sul (Chaparas, 1982). A tuberculose é, ainda, uma das infecções sérias mais comuns, senão a mais comum, da humanidade, com 8 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano, segundo relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS). Cerca de um terço da população mundial, ou seja, 1-2 biliões, poderá estar infectada com o bacilo, existindo cerca de 60 milhões de doentes com tuberculose em todo o mundo (Collins, 1993; Kaufmann et al, 1992; Snider, 1989).

A tuberculose pulmonar foi a principal causa de morte na Europa e Estados Unidos durante séculos. Com a descoberta da estreptomina em 1944 e da isoniazida em 1952, a tuberculose tornou-se uma doença curável. A introdução da rifampicina no final da década de 60, tornou os regimes de tratamento mais potentes e bem tolerados e aumentou a esperança de que a tuberculose fosse completamente eliminada num futuro próximo (Peloquin e Berning, 1994). No entanto, nos Estados Unidos, a partir de 1985 a incidência de casos de tuberculose tem vindo a aumentar (Rom e Zhang, 1993; Collins, 1993; Pitchenik e Fertel, 1992), além de terem vindo a aparecer estirpes multi-resistentes aos quimioterápicos. O aumento na incidência da tuberculose tem vindo a verificar-se devido à degradação das condições de vida e, principalmente, devido ao aumento do número de casos de SIDA (Peloquin e Berning, 1994; Neville et al, 1994; Rom e Zhang, 1993; Pitchenik e Fertel, 1992; Ehlers et al, 1994).

A tuberculose em Portugal tem vindo a decrescer lentamente desde 1958. No nosso país a tuberculose é a doença micobacteriana mais comum entre os doentes com SIDA, contrariando o que acontece em outros países desenvolvidos em que as micobactérias mais comuns a infectar estes doentes são as do complexo *M. avium* (MAC). Isto acontece, provavelmente, devido ao facto de Portugal ser uma zona endémica da tuberculose. Uma vez que esta doença tem ainda grande prevalência em Portugal, o aumento do número de casos de SIDA vai, certamente, agravar a incidência da tuberculose no nosso país (Antunes, 1993).

A lepra é uma doença ancestral, que nos nossos dias ainda afecta cerca de 15 milhões de indivíduos (Lagrange, 1987; de Vries et al, 1984). Esta doença atinge uma importância considerável nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina (Noordeen, 1991). Últimamente tem vindo a ocorrer uma redução significativa do números de casos de lepra, o que em parte se deve à implementação da terapia com múltiplas drogas (MDT), ao cumprimento dos regimes de tratamento por parte dos doentes e à melhoria das condições de vida (Yoder, 1993; Nordeen, 1991).

Aparentemente, a maioria dos indivíduos expostos ou infectados com *M. leprae* é capaz de montar uma resposta imune eficaz, não chegando a desenvolver doença. No entanto, uma minoria apresenta, de facto, sintomas clínicos os quais mostram grande variabilidade de indivíduo para indivíduo. Dependendo dos indivíduos, a expressão da doença pode variar entre dois polos (Ridley e Jopling, 1966). O polo lepromatoso é caracterizado por doença crónica, onde as lesões se encontram normalmente espalhadas por todo o corpo. Ocorre elevada produção de anticorpos específicos, e há ausência total de resposta imune celular específica, *in vitro* e *in vivo*. O polo tuberculóide é caracterizado por uma forma limitada da doença e pela ocorrência de uma vigorosa resposta celular. Nas lesões, restritamente localizadas, formam-se granulomas epitelióides, onde a resposta celular é intensa encontrando-se raros bacilos. Tanto no polo lepromatoso como no polo tuberculóide ocorrem lesões nos nervos, contribuindo para as deformidades encontradas em

cerca de 30% dos doentes. Existem também formas intermédias da doença, chamadas "borderline", que podem evoluir para o polo tuberculóide ("borderline" tuberculóide) ou lepromatoso ("borderline" lepromatoso) (Ridley e Jopling, 1966; de Vries et al, 1984; Bloom e Mehra, 1984; Lagrange, 1987; Kaplan e Cohn, 1991). Hoje em dia pensa-se que a maior ou menor susceptibilidade individual à lepra, além de depender de factores ambientais, é controlada geneticamente (de Vries et al, 1984; Lagrange, 1987).

A lepra e a SIDA não parecem estar associadas nos países que não constituem zonas endémicas da lepra (Yoder, 1993). No entanto, nos países em que ambas as infecções são endémicas podem ocorrer associadas. Nestes países, o colapso no sistema imunitário observado na SIDA conduz facilmente ao polo lepromatoso (Kennedy et al, 1990).

### 1.2. *Mycobacterium avium*

*M. avium* foi identificado em 1890 como o agente responsável por uma doença nas galinhas, de importantes consequências económicas. Em 1967, foi dado o nome *M. intracellulare* a um bacilo que tinha sido isolado alguns anos antes a partir de expectoração de doentes de um sanatório na Georgia, EUA (Battey State Hospital), tendo sido, nessa altura, denominado "bacilo de Battey" (Wolinsky, 1979; Wolinsky, 1992). No passado havia dificuldade em distinguir *M. avium* de *M. intracellulare*, excepto por seroaglutinação, sendo comum referi-las como *M. avium - intracellulare*, ou MAI. Nos dias de hoje, com base em antígenos glicolipídicos, são reconhecidos 28 serotipos neste complexo (Wolinsky, 1992; Inderlied et al, 1993). Utilizando sondas de DNA é possível identificar os serotipos 1 a 6, 8 a 11 e 21 como *M. avium* e os serotipos 7, 12 a 20 e 25 como *M. intracellulare*. A classificação dos serotipos 22 a 24 e 26 a 28 ainda não está estabelecida. Estas duas espécies de micobactérias e algumas outras estirpes ainda não caracterizadas e que poderão ser classificadas como uma nova espécie, constituem o complexo *M. avium* (MAC). As micobactérias deste complexo estão largamente distribuídas na natureza, podendo ser

encontradas em vários animais, solo, poeira e água salgada ou doce (Wolinsky, 1992). *M. scrofulaceum* apresenta algumas características genéticas comuns com MAC, tendo sido, no passado, incluído neste complexo. No entanto, dados de serologia e biologia molecular mostraram que *M. scrofulaceum* é taxonomicamente bastante diferente de *M. avium*, devendo assim serem consideradas espécies distintas uma da outra (Wolinsky, 1979; Wolinsky, 1992; Wayne, 1985).

Com o aparecimento da epidemia de SIDA, a doença causada pelo MAC, e principalmente a forma disseminada, tornou-se muito comum nos Estados Unidos, sendo diagnosticada, em vida, em 14% a 30% de doentes com SIDA (Pitchenik e Fertel, 1992; Good, 1985; Masur et al, 1993; Peloquin, 1993b) e sendo descrita em mais de 50% das autópsias realizadas nestes doentes (Pitchenik e Fertel, 1992). Nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos as micobactérias do MAC são as micobactérias mais comuns isoladas de doentes com SIDA e causam uma das mais frequentes infecções oportunistas descritas nestes doentes (Pitchenik e Fertel, 1992; Collins, 1986). Em países em vias de desenvolvimento, por exemplo Portugal, *M. tuberculosis* é isolado mais frequentemente em indivíduos com SIDA (Pitchenik e Fertel, 1992; Good, 1985; Antunes, 1993). A infecção por MAC ocorre caracteristicamente nos doentes em que o número de linfócitos T CD4+ é baixo (<100 células/mm<sup>3</sup>), ou seja, quando a infecção por HIV está em fase avançada (Masur et al, 1993; Peloquin, 1993b; Horsburgh, 1991) e a infecção disseminada causada por agentes do MAC contribui grandemente para a morbidade e mortalidade nestes doentes (Benson e Ellner, 1993).

Os sintomas da doença localizada associada às micobactérias do MAC incluem adenite cervical, pneumonite, disfunção hepática, lesões cutâneas, endoftalmite e abscessos. Quanto aos sintomas de doença disseminada, pode-se referir a febre, perda de peso, suores noturnos, diarreia, dor abdominal, anemia, e uma elevada concentração sérica de fosfatase alcalina. Muitas vezes os doentes também apresentam linfadenopatia intra-abdominal ou hepatosplenomegalia (Masur et al, 1993; Horsburgh, 1991; Young, 1988a).

Ao contrário da tuberculose, pensa-se que a doença causada pelos agentes do MAC não é contraída pelo contacto pessoal mas sim de fontes ambientais. Várias evidências apoiam esta interpretação, nomeadamente a infecção gastrointestinal ser bastante mais frequente do que a infecção pulmonar entre os doentes com SIDA e, também nestes doentes, a prevalência da doença por micobactérias do MAC ser semelhante em todos os grupos de risco, independentemente do nível sócio-económico, do sexo e da raça (Pitchenik e Fertel, 1992).

É provável que, uma vez que as estirpes pertencentes ao MAC estão largamente distribuídas na natureza, a colonização pulmonar e intestinal em humanos seja frequente (Collins, 1986). Apesar de apenas uma minoria dos indivíduos saudáveis colonizados chegar a desenvolver doença activa, tem-se vindo a verificar um aumento do número de casos de infecção por agentes do MAC em indivíduos não infectados pelo HIV, o que tanto se poderá dever a uma maior incidência, como a existirem presentemente melhores métodos de detecção de micobactérias do MAC em laboratórios de bacteriologia (Pedrosa et al, 1994). No entanto, a infecção pelas micobactérias do MAC em indivíduos não doentes com SIDA é rara e consiste classicamente numa doença pulmonar com fibrocavidades, crónica e lentamente progressiva. Ocorre principalmente em pessoas de meia idade e muitas vezes do meio rural, com predisposição pulmonar, geralmente com baixa capacidade de drenagem dos pulmões (ex: bronquite crónica e enfisema, bronquiectasias e pneumoconioses). A doença extrapulmonar em indivíduos não doentes com SIDA ocorre principalmente sob a forma de linfadenite em crianças em idade pré-escolar e a ocorrência de doença disseminada é muito rara, mesmo entre doentes imunodeprimidos (Pitchenik e Fertel, 1992; Masur, 1993). Porém, nos últimos tempos tem vindo a aumentar a incidência de infecção por MAC também em indivíduos "normais", ou seja, aparentemente sem condições de predisposição. Evidências apontam para o facto de estes indivíduos (apesar de aparentarem normalidade) apresentarem uma vulnerabilidade aumentada devido a terem herdado uma possível deficiência do tecido conjuntivo (Iseman, 1989).

As estirpes de MAC apresentam um largo espectro de susceptibilidade às drogas. Porém, na generalidade, a isoniazida (droga "chave" no tratamento da tuberculose) não é adequada para o tratamento destas infecções. Outras drogas implicadas na inibição da síntese da parede celular parecem ter um efeito mais positivo na infecção por MAC, como os inibidores da síntese de ácidos micólicos. Dentre estes, a tiacetazona é, talvez, uma das drogas mais activas contra MAC (Peloquin, 1993a). As drogas usadas em regimes de tratamento são a rifampicina, azitromicina, sparfloxacina, clofazimina, etambutol, rifabutina, ciprofloxacina e amicacina (Pitchenik e Fertel, 1992; Masur et al, 1993; Benson, 1994). Assim como no caso da tuberculose e da lepra, os regimes de tratamento incluindo duas ou mais drogas terão maiores probabilidades de sucesso (Masur et al, 1993; Benson, 1994).

## **2. Aspectos estruturais e fisiológicos das micobactérias**

As micobactérias são bacilos Gram-positivo, contendo uma parede celular espessa e abundantemente lipídica (portanto, hidrofóbica). A parede celular confere a este género bacteriano a sua álcool-ácido resistência característica. Ela é composta por uma série de proteínas solúveis, carboidratos e lípidos e, basicamente, por três componentes macromoleculares insolúveis: arabinogalactano, peptidoglicano e ácidos micólicos. O peptidoglicano hidrofílico - semelhante ao de muitas outras bactérias - está ligado covalentemente ao arabinogalactano estando, por sua vez, este complexo ligado, também covalentemente, a uma quantidade apreciável de resíduos esterificados de ácido micólico, de alto peso molecular e altamente hidrofóbicos (Goren e Brennan, 1979). Estes resíduos estão orientados para o exterior da camada de peptidoglicano, formando várias camadas. No seu conjunto, os três componentes insolúveis constituem o núcleo micolilarabinogalactanopeptidoglicano, da parede celular, ou seja, um dos dois lipopolissacarídeos (LPS) comuns a todas as micobactérias. No MAC, este núcleo encontra-se frequentemente rodeado por glicopeptidolípido (GPL) que lhe são específicos. Todas as



micobactérias possuem um segundo LPS na sua parede, especificamente, um lipoarabinomanano (LAM), que se encontra ancorado na membrana plasmática. O micolilarabinogalactanopeptidoglicano, o LAM e os GPLs do MAC são altamente imunogénicos, com propriedades semelhantes às dos LPS de outras bactérias (Inderlied et al, 1993).

Os serotipos do MAC distinguem-se por diferenças antigénicas dos oligossacarídeos constituintes dos GPL, antigamente referidos como C-micosídeos ou antigénios de Shaefer (Inderlied et al, 1993). Estes antigénios formam uma estrutura protectora em torno da micobactéria, particularmente espessa quando esta é internalizada por uma célula fagocítica. Ao microscópio electrónico de transmissão, essa estrutura corresponde a uma zona transparente ao feixe electrónico (Barrow et al, 1980).

Quando uma estirpe de *M. avium* é cultivada em meio de cultura sólido sintético, poderão ser identificadas pelo menos três variantes coloniais: lisa opaca (SmOp), lisa transparente (SmTr) e rugosa (Rg). Ao nível macroscópico as colónias SmOp são húmidas, lisas, circulares, elevadas e opacas; as SmTr também são caracteristicamente húmidas, lisas ou enrugadas, circulares, achatadas e transparentes; as Rg são secas, enrugadas, com forma irregular, elevadas e opacas. A base molecular destas diferenças morfológicas constitui, ainda, assunto de controvérsia, embora se considere que poderão estar envolvidos glicolípidos (Belisle and Brennan, 1989) e proteínas (Prinzis et al, 1994).

Os antigénios da parede celular das micobactérias podem estar envolvidos em fenómenos característicos da patogenicidade de certos organismos deste grupo, como por exemplo, a inibição da fusão fagossoma-lisossoma. A perturbação causada no macrófago pelos antigénios de superfície de micobactérias patogénicas poderá ter um efeito importante no processamento e apresentação de antigénios pertencentes às micobactérias intactas (Young, 1988b). De facto, o sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de rato tratados com GPL de *M. avium* demonstrou ter um efeito inibidor da linfoproliferação de linfócitos esplénicos (Pourshafie et al, 1993). O fragmento lipopeptídico obtido a partir do

GPL demonstrou ter um efeito na inibição da blastogénese induzida por mitogénios em células esplénicas de ratinho (Tassell et al, 1992).

A indução de uma resposta imune protectora na infecção micobacteriana em modelos animais requer, na generalidade, que a imunização seja realizada com organismos vivos. Uma das explicações possíveis para este facto pode dever-se à importância da secreção de antigénios protectores específicos pelo microrganismo. Várias proteínas existentes no filtrado de cultura de *M. bovis* BCG foram identificadas e caracterizadas. Estes antigénios são específicos nas diferentes espécies de micobactérias, existindo também, entre estas espécies diferenças quantitativas na sua secreção. Não se sabe, porém, se o padrão de secreção de proteínas de micobactérias em meios de cultura sintéticos será comparável ao padrão secretado por micobactérias crescendo no interior de uma célula fagocítica (Young, 1988b).

Quando uma micobactéria entra numa célula fagocítica, muito provavelmente ela será sujeita à privação de nutrientes e limitação de iões metálicos, para além de se encontrar exposta a enzimas degradativas e radicais tóxicos de oxigénio. A adaptação a estas novas condições de sobrevivência poderá envolver uma alteração significativa do metabolismo bacteriano e da síntese proteica, comparando com o observado durante o seu crescimento em meio de cultura sintético. Vários dos antigénios proteicos micobacterianos identificados por anticorpos monoclonais são, de facto, homólogos de proteínas de "stress". Assim, evidências apontam para o facto de o reconhecimento de proteínas de "stress" desempenhar um papel importante na resposta imune às micobactérias (Young, 1988b; Young e Mehlert, 1989).

### **3. Interacção micobactéria-hospedeiro**

#### **3.1. Primeira linha de defesa do hospedeiro à infecção: barreiras naturais**

O hospedeiro contém um número de defesas que fazem parte integrante da sua anatomia e fisiologia. Estas defesas podem ser físicas ou químicas (Talaro e Talaro, 1993; Brock e Madigan, 1991). No entanto, apesar de todas estas barreiras físicas e químicas, muitos microrganismos patogénicos para o homem conseguem produzir infecção, tendo para isso desenvolvido adaptações estratégicas. De facto, os mecanismos de defesa do hospedeiro são desenhados para negar o acesso a microrganismos; o aparelho genético dos micróbios foi seleccionado para ultrapassar essas defesas. A estratégia seguida por um agente patogénico para evitar, subverter ou anular as defesas existentes num hospedeiro é, provavelmente, a sua característica mais específica. A probabilidade de desenvolvimento de doença como consequência da interacção entre microrganismo e hospedeiro é um reflexo do balanço entre as características microbianas que lhe permitirão ultrapassar as defesas do hospedeiro, e a capacidade do hospedeiro limitar a proliferação microbiana (Bliska et al, 1993).

#### **3.2. Variabilidade na virulência das estirpes de *M. avium***

A espécie *M. avium* é constituída por um elevado número de estirpes que podem ser isoladas de diversas fontes. A virulência destas estirpes apresenta uma grande variabilidade. Assim, as estirpes de *M. avium* isoladas de doentes com SIDA são diferentes das isoladas de doentes sem SIDA e das estirpes isoladas do ambiente ou de animais infectados (Crowle et al, 1986; Horsburgh, 1991; Pedrosa et al, 1994). No nosso laboratório, foi realizado um estudo comparativo da virulência, para o ratinho BALB/c, susceptível ao *M. avium*, de estirpes isoladas de animais, de doentes sem SIDA, de doentes com SIDA e do ambiente

(Pedrosa et al, 1994). As estirpes isoladas de animais infectados apresentaram maior virulência para o ratinho, as estirpes isoladas de doentes com SIDA apresentaram virulência intermédia, as isoladas de doentes sem SIDA demonstraram virulência variável, dependendo da estirpe (desde alta virulência até avirulência) e as isoladas de fontes ambientais não apresentaram virulência para o ratinho. Nos animais poderão ter sido seleccionadas as estirpes mais virulentas, uma vez que estas estirpes encontraram hospedeiros saudáveis, sem qualquer defeito na imunidade, enquanto que as estirpes isoladas de doentes com SIDA não necessitam de ser tão virulentas uma vez que infectam hospedeiros imunodeprimidos. A grande heterogeneidade encontrada entre as estirpes isoladas de doentes sem SIDA poderá sugerir uma heterogeneidade no estado de imunidade entre os indivíduos infectados. O facto de as estirpes ambientais não apresentarem virulência para o ratinho sugere que estas se adaptaram a crescer fora de células animais, podendo apenas infectar hospedeiros imunodeprimidos (Pedrosa et al, 1994).

Para além da variabilidade na virulência encontrada entre diferentes estirpes de *M. avium*, uma só estirpe pode também apresentar diferentes virulências, dependendo do seu morfotipo colonial. Assim, para algumas estirpes o morfotipo SmTr é altamente virulento para a galinha e o ratinho, o morfotipo SmOp é geralmente não virulento (Moehring e Solotorovsky, 1965; Schaefer et al, 1970; Pattyn e Hermans-Boveroulle, 1970; Anz e Meissner, 1972), e o morfotipo Rg já foi caracterizado como não-virulento (Moehring e Solotorovsky, 1965; Pattyn e Hermans-Boveroulle, 1970) e como altamente virulento (Moehring e Solotorovsky, 1965; Schaefer et al, 1970). Na infecção *in vitro* de macrófagos por uma dada estirpe de *M. avium*, o morfotipo SmOp parece induzir maior produção de determinadas citocinas pelo macrófago do que o morfotipo SmTr, o que poderá estar relacionado com a sua menor virulência (Michelini-Norris et al, 1992; Shiratsuchi et al, 1993). A maioria das estirpes isoladas de animais ou de indivíduos doentes apresentam o morfotipo SmTr, mas podem reverter para o morfotipo SmOp se forem cultivadas *in vitro* durante um longo período de tempo (Shiratsuchi et al, 1993).

Neste momento ainda não se conhecem com rigor as diferenças bioquímicas que caracterizam as diferentes estirpes ou os diferentes morfotipos.

### **3.3. Resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *M. avium***

A capacidade de resistência de um hospedeiro às infecções provocadas por uma grande variedade de vírus, bactérias ou parasitas, é fortemente influenciada por factores genéticos. Com efeito, nas áreas endémicas de tuberculose e de lepra têm-se observado claras diferenças na susceptibilidade à infecção entre a população humana (Vidal et al, 1993). Para além desta constatação, estudos realizados sugerem que a raça negra é mais susceptível à tuberculose do que a raça caucasiana, e que a base para essa diferença genética reside numa capacidade bacteriostática diferencial nos macrófagos dos hospedeiros (Crowle e Elkins, 1990).

No ratinho, a resistência inata à infecção por espécies micobacterianas como *M. lepraemurium* (Brown et al, 1982), *M. bovis* BCG (Gros et al, 1983), *M. intracellulare* (Goto et al, 1984) e *M. avium* (ver artigos nº1 e nº3, e Stokes et al, 1986) está também sob controlo genético. O controlo da resistência inata, que é encontrada na fase inicial da infecção, depende da expressão de um gene dominante localizado no cromossoma 1, designado por *Bcg*, embora haja evidências de estarem também envolvidos outros genes, o que sugere que o controlo da resistência natural às micobactérias é mais complexo do que o previsto inicialmente (Orme et al, 1986).

O gene *Bcg* pode estar presente em duas formas alélicas nas estirpes "inbred": o alelo *Bcg*<sup>r</sup> (confere resistência e é dominante) e o alelo *Bcg*<sup>s</sup> (confere susceptibilidade e é recessivo). O locus *Bcg* é idêntico a dois outros genes designados por *Ity* e *Lsh* que controlam a resistência natural à infecção por *Salmonella typhimurium* (Plant e Glynn, 1976) e *Leishmania donovani* (Bradley et al, 1979), respectivamente. O tipo celular responsável

pela expressão fenotípica do gene é derivado da medula óssea, é relativamente resistente a radiação, podendo ser inativado por exposição crónica à sílica, a qual é nefasta para o macrófago (Gros et al, 1983). Para além destes dados, macrófagos isolados de ratinhos *Bcg<sup>r</sup>* e *Bcg<sup>s</sup>*, apresentam uma capacidade diferencial de restrição do crescimento de BCG (Stach et al, 1984), *M. intracellulare* (Goto et al, 1989), *M. smegmatis* (Denis et al, 1990), *M. avium* (Stokes et al, 1986; artigo nº 1), *S. typhimurium* (Lissner et al, 1983) e *L. donovani* (Crocker et al, 1984), o que indica que este tipo celular expressa a diferença genética. O mecanismo pelo qual os macrófagos *Bcg<sup>r</sup>* exercem maior actividade bacteriostática ou bactericida não está ainda esclarecido, embora estes macrófagos sejam superiores aos *Bcg<sup>s</sup>* no respeitante à expressão do antígeno Ia e apresentação de antígenos (Denis et al, 1988a), e à produção de radicais tóxicos de oxigénio e azoto (Denis et al, 1988b; Blackwell et al, 1991).

Vidal et al isolaram um gene no cromossoma 1 do ratinho que, com grande probabilidade, corresponde ao gene *Bcg*, designando-o *Nramp* (Vidal et al, 1993). A expressão de *Nramp* está restrita, na generalidade, ao sistema retículo-endotelial e, em particular, aos macrófagos tecidulares. Este gene codifica uma proteína de 484 aminoácidos com um peso molecular previsto de cerca de 53 kDa, que apresenta, na sua sequência primária, homologia com uma variedade de proteínas de transporte bacterianas e eucarióticas e, particularmente, com uma proteína transportadora de nitrato. A análise dos níveis de RNAm em macrófagos controlo e infectados revelou que o nível de expressão do gene *Nramp* era semelhante nos ratinhos *Bcg<sup>r</sup>* e *Bcg<sup>s</sup>*, não se alterando significativamente durante a infecção *in vivo*. No entanto, verificou-se que as estirpes de ratinhos resistentes apresentavam, no nucleótido 783, uma guanina, enquanto que as estirpes susceptíveis, nesse mesmo nucleótido, apresentavam uma adenina. Esta mutação pontual provoca a substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido ácido aspártico na posição 105 dum domínio transmembranar da proteína, o que poderá afectar a orientação, inserção ou estabilidade desse domínio na bicamada lipídica. Deste modo, a função da proteína transportadora codificada

por *Nramp* estaria comprometida nos macrófagos de ratinhos *Bcg*<sup>s</sup>. Os autores deste trabalho especulam que a proteína *Nramp* poderá funcionar como um transportador de nitrito ou nitrato para o fagossoma, ou outras substâncias que tenham também um efeito nefasto para os bacilos no interior do fagossoma.

Como já foi referido acima, o controlo genético da infecção por micobactérias não dependerá exclusivamente do gene *Bcg*, mas será multifactorial. No modelo experimental do ratinho a influência de diferentes genes depende da via de inoculação, da dose do inóculo, da fase da infecção e do parâmetro particular da resposta do hospedeiro estudado (Brett et al, 1992). Assim como o gene *Bcg* influencia o controlo da infecção micobacteriana por via intravenosa em fase inicial (mas não por via respiratória), outros genes pertencentes, ou não, ao complexo maior de histocompatibilidade do ratinho (sistema H-2), foram implicados em várias outras respostas do hospedeiro às micobactérias (Schrier et al, 1982; Brett e Ivanyi, 1990; Brett et al, 1992).

### **3.4. O macrófago**

Os macrófagos são uma população de fagócitos mononucleares largamente distribuídos no organismo dos mamíferos, sendo responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios. A sua enorme distribuição nos tecidos, faz com que estas células desempenhem um papel importante na defesa imediata contra elementos externos, antes que ocorra migração leucocitária. Os monócitos circulantes constituem uma fonte permanente de células macrofágicas funcionalmente competentes, capazes de infiltrar os tecidos. Uma vez que os macrófagos participam na imunidade específica, via apresentação de antigénio e produção de interleucinas que induzem e regulam a actividade das células T, e na imunidade não específica contra bactérias, vírus, fungos e células neoplásicas, não é de estranhar que os macrófagos possuam um elevado número de diferentes fenótipos, quer do ponto de vista funcional, quer do ponto de vista morfológico (Rutherford et al, 1993).

### a) Mielopoiese e diferenciação

Conhecem-se onze factores de crescimento que controlam o processo da hematopoiese (Dorshkind, 1990). Três destas glicoproteínas iniciam a diferenciação dos macrófagos a partir de células progenitoras uni e bipotenciais na medula óssea. A progressão de uma célula pluripotencial para uma célula progenitora restritamente mielóide é controlada pela IL-3, que gera a progenia diferenciada de todas as linhas celulares mielóides. À medida que os progenitores macrofágicos se diferenciam sob o controlo da IL-3, tornam-se sensíveis à acção de dois factores de crescimento implicados na diferenciação de progenitores restritamente pertencentes à linha monocítica-macrofágica: "factor estimulador de colónias granulocíticas-macrofágicas" (GM-CSF) e "factor estimulador de colónias macrofágicas" (M-CSF). Após este compromisso definitivo com a sua linhagem, as células tornam-se dependentes destes factores de crescimento para continuarem a proliferar e se manterem viáveis. Outra citocina, o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), tem sido implicado na regulação da proliferação dos precursores macrofágicos (Guilbert et al, 1993). A expressão de TNF- $\alpha$  pelas células da medula óssea parece ser um acontecimento tardio necessário para a diferenciação final dos macrófagos. A IL-6 tem um papel importante para a manutenção das células hematopoiéticas primitivas, particularmente das células da linhagem granulocítica-macrofágica. Alguns agentes inibem a síntese de DNA por progenitores mielóides, não promovendo a sua diferenciação, como por exemplo, as prostaglandinas da série E (PGEs), principalmente PGE<sub>2</sub>, interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) e factor de crescimento transformador-beta (TGF- $\beta$ ) (Rutherford, 1993).

Diferenciação é o processo de desenvolvimento ao longo de uma linhagem celular progressivamente mais restrita. Este acontecimento é normalmente irreversível e é influenciado por factores de crescimento. Uma vez que, na diferenciação dos macrófagos, não ocorrem os rearranjos genómicos que definem o desenvolvimento linfocitário, a



definição da diferenciação do macrófago depende, largamente, da análise de características físicas ou funcionais, como modo identificativo dos estados de desenvolvimento (Rutherford et al, 1993). Com efeito, durante a diferenciação dos macrófagos, aparecem à superfície da célula determinados antigénios que estavam ausentes em fases anteriores de desenvolvimento, assim como desaparecem outros antigénios de superfície presentes nos precursores do macrófago (Terstappen et al, 1992; Gessani et al, 1993), o mesmo fenómeno acontecendo com a expressão de certos genes (Rutherford et al, 1993). A diferenciação de monócitos para macrófagos pode também corresponder a uma capacidade de produção diferencial de citocinas (Gessani et al, 1993).

#### b) Heterogeneidade

Em primeiro lugar, ao discutir o problema da heterogeneidade, é necessário focar que os macrófagos diferem de espécie para espécie e de estirpe para estirpe, dentro da mesma espécie animal. Assim, não se podem fazer extrapolações directas para a espécie humana, a partir de resultados obtidos com macrófagos de ratinho, nem considerar que os resultados obtidos para uma dada estirpe de ratinho serão os mesmos para todas as estirpes. No entanto, mesmo se considerarmos um mesmo indivíduo de uma determinada espécie e estirpe, os macrófagos isolados de diferentes localizações anatómicas possuem uma diversidade de fenótipos e capacidades. Uma vez que a função macrofágica depende, em parte, de sinais recebidos do microambiente onde a célula se encontra, foi sugerido que a heterogeneidade das populações macrofágicas se deve às condições únicas encontradas em cada tecido. De facto, cada tecido determina o fenótipo da sua população de macrófagos residentes (Rutherford et al, 1993). Assim, é sabido que qualquer conclusão retirada de um trabalho realizado com uma população de macrófagos isolados de um determinado tecido, não se aplica necessariamente a outra população isolada de um outro tecido do mesmo animal. Esta heterogeneidade é não só morfológica, como também funcional: estudos realizados em

macrófagos de rato utilizando anticorpos monoclonais, demonstraram que macrófagos isolados de diferentes tecidos apresentavam diferenças na expressão dos seus epítopes, diferenças essas existentes mesmo entre macrófagos provenientes de diversas regiões de um determinado tecido (Damoiseaux et al, 1989; Gordon et al, 1992); numerosos estudos demonstram também a diversidade funcional existente entre macrófagos de diferentes tecidos, nomeadamente na secreção de TNF- $\alpha$  (Tachibana et al, 1992), produção de IL-1b (Wewers e Herzyk, 1989) e metabolismo do ácido araquidónico (Wu et al, 1989).

A heterogeneidade dos macrófagos não se deve apenas à influência do microambiente encontrado nos diferentes tecidos. Com efeito, os macrófagos isolados de um determinado tecido podem ser também heterogénios. Por exemplo, apenas uma baixa percentagem dos macrófagos peritoneais residentes de ratinho expressam níveis baixos da enzima 5'-nucleotidase; no entanto, após estimulação da cavidade peritoneal, encontram-se nesta cavidade predominantemente macrófagos com baixa actividade daquela enzima (Rutherford et al, 1993), presumivelmente devido ao influxo de monócitos. Parece, então, ser viável a hipótese de que a diferenciação e senescência do macrófago são acompanhadas da expressão transitória de fenótipos bem definidos. Assim sendo, a heterogeneidade funcional pode resultar da diversidade de estados de maturação encontrados entre os macrófagos de uma dada população, não só devido ao influxo de monócitos, como também à proliferação local de precursores macrofágicos. De facto, a proliferação local de progenitores de macrófagos é, provavelmente, suficiente para a renovação e manutenção das populações de macrófagos residentes dos diversos tecidos (Alliot et al, 1991; Metcalf et al, 1992).

Finalmente, a heterogeneidade macrofágica pode também dever-se à proliferação de diferentes tipos de células progenitoras. Com efeito, os monócitos circulantes apresentam heterogeneidade (Campbell et al, 1989), apesar de todos eles estarem sujeitos ao mesmo microambiente e de, provavelmente, não passarem tempo suficiente no sangue para gerar uma variedade de estados de maturação; está também descrito que colónias de macrófagos derivados da medula óssea podem ser divididas em subtipos, expressando diferentes

fenótipos moleculares (Rutherford et al, 1993). Há, também que distinguir entre hematopoiese normal e hematopoiese na presença de agentes inflamatórios ou infecciosos. De facto, parecem existir diferenças nos precursores da medula óssea encontrados durante uma resposta inflamatória, o que se poderá dever às diferentes combinações de factores de crescimento no microambiente hematopoiético, que vão determinar a heterogeneidade das populações de macrófagos (Rutherford et al, 1993).

### c) Interacção micobactéria-macrófago

Os microrganismos parasitas intracelulares residem num determinado local do hospedeiro onde podem sobreviver e multiplicar-se, apesar da acção de mecanismos de defesa celular e humoral existentes.

A entrada dum microrganismo nas células do hospedeiro realiza-se pela invasão de células não fagocíticas, ou pela fagocitose desse microrganismo por fagócitos profissionais (Drevets et al, 1993). No primeiro mecanismo o microrganismo liga-se à célula alvo e seguidamente induz a sua própria internalização. Uma vez dentro de uma célula que não é um fagócito profissional, o microrganismo prolifera mais facilmente. No segundo mecanismo, a internalização do microrganismo é dirigida pela célula do hospedeiro, uma vez que ela é iniciada quando receptores do fagócito profissional se ligam a ligandos específicos no microrganismo; outro aspecto importante deste mecanismo consiste na capacidade microbicida potente do fagócito, que os microrganismos têm de alterar ou evitar para conseguirem sobreviver e multiplicar-se. Até há alguns anos atrás, era aceite que a capacidade bactericida do macrófago activado não era específica para cada espécie ou género bacteriano, mas sim que os macrófagos activados teriam a capacidade de eliminar todos os tipos de microrganismos mais eficientemente. No entanto, numerosas experiências vieram demonstrar que a activação do macrófago poderá corresponder a uma maior actividade bactericida contra certos géneros ou espécies bacterianos, mas não contra outros (Van Dissel et al, 1987; Van

Furth, 1990). Isto deve-se, provavelmente, ao facto da activação do macrófago ser um fenómeno muito heterogéneo e também ao facto de diferentes bactérias possuírem diversos mecanismos para ultrapassar essa mesma activação.

As micobactérias que atingem o interior do organismo de um hospedeiro, vão ser internalizadas através do segundo mecanismo, indo residir no interior dos macrófagos (*M. leprae* pode ser também internalizada através do primeiro mecanismo, sendo por isso frequentemente encontrados bacilos em células normalmente não fagocíticas, como células de Schwann e células de Langerhans - Birdi e Antia, 1989). Assim, o primeiro evento necessário ao estabelecimento de uma infecção micobacteriana é a internalização dos bacilos por células fagocíticas.

Estudos realizados por diversos investigadores mostraram que os receptores do complemento tipo 1 (CR1 ou CD35), tipo 3 (CR3 ou CD11b/CD18) ou tipo 4 (CR4 ou CD11c/CD18) estão envolvidos na fagocitose pelos macrófagos de bactérias parasitas intracelulares como *Legionella pneumophila* (Payne e Horwitz, 1987), *L. monocytogenes* (Drevets e Campbell, 1991), MAC (Bermudez et al, 1991), *M. leprae* (Schlesinger e Horwitz, 1991), *M. tuberculosis* (Schlesinger et al, 1990), e algumas espécies de *Salmonella* (Ishibashi e Arai, 1990). Várias espécies de micobactérias incluindo *M. leprae*, *M. tuberculosis* e *M. bovis* ligam-se também à fibronectina sérica através dum receptor de peso molecular 30 kDa e são posteriormente internalizadas pelos macrófagos através do receptor para a fibronectina (Inderlied et al, 1993).

A fagocitose de *M. avium* por monócitos e macrófagos parece ocorrer através de diferentes mecanismos. Na presença de soro, a ligação ao CR3 (após ligação da bactéria ao factor do complemento C3bi) e à fibronectina sérica parece constituir a forma preferencial de invasão (Bermudez et al, 1991). No entanto, formas alternativas de fagocitose podem ocorrer, através da ligação do microrganismo ao receptor de manose dos macrófagos e também ao CR3, mesmo sem a prévia ligação da bactéria a factores do complemento (Bermudez et al, 1991). Está, no entanto, descrito que a fagocitose de MAC por monócitos

isolados de sangue periférico humano é fortemente favorecida pela presença de soro, sendo o complemento o factor sérico mais importante nesse evento (Swartz et al, 1988). Este efeito é, porém, mais evidente durante as primeiras 2 horas de incubação dos macrófagos com os bacilos, uma vez que após 24 horas de incubação, macrófagos em presença ou ausência de soro e incubados com *M. avium*, foram capazes de ingerir um número comparável de micobactérias (Bermudez e Young, 1987).

A internalização do microrganismo através de diferentes receptores pode influenciar e até dirigir o destino dos parasitas após a fagocitose. Esta hipótese é, de facto, apoiada por vários resultados descritos na literatura: (i) a utilização de uma via independente do receptor Fc para a internalização pode trazer vantagens para a bactéria, pois a fagocitose realizada através dos receptores Fc, mas não através dos receptores do complemento, ocorre associada à produção de anião superóxido pelas células fagocíticas (Wright e Silverstein, 1983); (ii) está descrito que, apesar de CR1 e CR3 desempenharem um papel importante na fagocitose por macrófagos humanos de estirpes virulentas (Erdman e H37Rv) e de uma estirpe não virulenta (H37Ra) de *M. tuberculosis*, o receptor de manose no macrófago é importante apenas para a internalização das estirpes virulentas, não estando envolvido na internalização da estirpe avirulenta testada (Schlesinger, 1993); (iii) a internalização via CR3 parece ser necessária para a actividade listericida de macrófagos peritoneais de ratinho (Drevets et al, 1993), uma vez que após bloqueio desse receptor utilizando um anticorpo monoclonal, esses macrófagos perderam a sua capacidade listericida; (iv) *Salmonella typhimurium* e *Salmonella typhi* parecem ser internalizadas pelos receptores CR1 e CR3, respectivamente, e a internalização via CR3, mas não via CR1, promove a subsequente fusão fagolisossomal em macrófagos peritoneais de ratinho (Ishibashi e Arai, 1990). Todos estes dados sugerem que diferenças nas vias de internalização dos bacilos poderão influenciar a sua sobrevivência intracelular.

Uma vez completada a internalização da bactéria pelo macrófago, é nesta célula que vai ser decidido o destino dos microrganismos. Assim, pode ocorrer a multiplicação dos

bacilos ou uma situação de estase e até de morte bacilar, se o macrófago estiver com os mecanismos antimicobacterianos activados ou se a micobactéria infectante fôr de baixa virulência.

Actualmente não existem dúvidas de que os macrófagos activados desempenham uma importante função antimicobacteriana (Bermudez e Young, 1987). A activação do macrófago consiste no exarcebamento de determinadas funções macrofágicas que permitem a potenciação da actividade microbiostática/microbicida ou da actividade anti-tumoral destas células. Nesta dissertação irão ser focados especialmente aspectos da activação do macrófago relacionados com a actividade antimicobacteriana, dando particular ênfase à infecção por *M. avium*.

Os mecanismos macrofágicos que podem estar envolvidos na actividade antimicobacteriana destas células, compreendem a acção dos lisossomas, o pH fagossomal, a actividade dos radicais tóxicos de oxigénio (ROI) e de azoto (RNI), a produção de outros compostos tóxicos pelas células e a limitação de nutrientes (Lowrie e Andrew, 1988).

Embora durante a activação do macrófago aumente a concentração de enzimas lisossomais, este aumento não terá provávelmente consequências na actividade antimicobacteriana desta célula. De facto, a maioria das micobactérias patogénicas são altamente resistentes à digestão pelas enzimas lisossomais do macrófago, mesmo quando mortas (Andrew et al, 1985), e componentes da parede micobacteriana podem inibir algumas das enzimas lisossomais. No entanto, o lisossoma possui ambiente acídico, que não é favorável à multiplicação dos microrganismos, além de potenciar a toxicidade de outros factores, como ROI (Lowrie, 1983). Assim, alguns parasitas intracelulares, nomeadamente algumas micobactérias, desenvolveram formas de evitar a exposição ao conteúdo lisossomal. Para cada espécie micobacteriana a forma particular de evasão ao conteúdo lisossomal é influenciada por variáveis como a virulência bacteriana, a espécie do hospedeiro e o estado de activação do macrófago (Lowrie e Andrew, 1988).

Está descrito que tanto *M. avium* (Fréhel et al, 1986) como *M. tuberculosis* (Armstrong e D'Arcy Hart, 1971), *M. leprae* (Sibley et al, 1987) e *M. microti* (D'Arcy Hart et al, 1987), são capazes de inibir a fusão fagossoma-lisossoma em certa extensão. Macrófagos derivados da medula óssea (BMMØ) isolados de ratinhos *Bcg<sup>r</sup>* infectados por uma estirpe virulenta de *M. avium* (a estirpe TMC 724, que é a mesma que a estirpe ATCC 25291 utilizada no presente trabalho) conseguem restringir o crescimento dessa estirpe, o mesmo não acontecendo com BMMØ provenientes de ratinhos *Bcg<sup>s</sup>* (De Chastellier et al, 1993). Nos macrófagos *Bcg<sup>r</sup>*, foi observada o dobro da percentagem de fusões fagossoma-lisossoma comparativamente aos macrófagos *Bcg<sup>s</sup>*, o que indica que a fusão fagossoma-lisossoma poderá desempenhar um papel importante no controlo do crescimento intracelular do *M. avium* (De Chastellier et al, 1993). Nesta situação, os macrófagos *Bcg<sup>s</sup>* terão sido mais susceptíveis à inibição da fusão induzida por *M. avium*.

Os mecanismos pelos quais as micobactérias interferem com a fusão fagolisossomal normal ainda não estão esclarecidos. Poderá estar envolvida uma associação directa entre os lípidos da superfície bacteriana e os lípidos da membrana do fagossoma (Lowrie e Andrew, 1988), o que foi sugerido por Fréhel e Rastogi, uma vez que, após ligação de anticorpos a *M. leprae*, é impedida a inibição da fusão fagolisossomal (Fréhel e Rastogi, 1987). Esta observação sugere um papel dos factores humorais na protecção do hospedeiro. Resultado contraditório é, no entanto, apresentado por Sibley et al (Sibley et al, 1987) que, trabalhando em macrófagos residentes peritoneais de ratinho, não encontraram qualquer aumento da capacidade de fusão fagolisossomal após tratamento de *M. leprae* viável com soro humano rico em anticorpos específicos para o antígeno de superfície glicolípido fenólico.

Outros mecanismos podem estar envolvidos na inibição da fusão fagossoma-lisossoma, como por exemplo, a inibição dos movimentos saltatórios dos lisossomas (D'Arcy Hart et al 1983), através da libertação, pela micobactéria, de lípidos acídicos, amónia e nucleótidos cíclicos (Lowrie, 1983). Devido à redução dos movimentos lisossomais, a possibilidade de contacto entre o fagossoma e o lisossoma ficaria reduzida.

*M. avium* pode também perturbar a fusão de pinossomas com lisossomas e fagolisossomas (Fréhel et al, 1986), o que poderá interferir não só com a normal apresentação de antigénios, mas também com o transporte de drogas antimicobacterianas para o compartimento celular onde os bacilos se encontram.

Algumas bactérias intracelulares conseguem escapar do fagossoma, impedindo assim a exposição do microrganismo ao ambiente desfavorável do lisossoma que ocorreria após a fusão. São exemplos destas bactérias *L. monocytogenes* (De Chastellier e Berche, 1994), e *M. leprae* (Lowrie e Andrew, 1988; Birdi e Antia, 1989).

Outros microrganismos conseguiram adaptar-se, sobrevivendo e multiplicando-se expostos ao conteúdo lisossomal, no fagolisossoma, como é o caso de *M. lepraemurium* (Lowrie e Andrew, 1988). Como *M. avium* inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma apenas parcialmente, esta micobactéria é também capaz de sobreviver no ambiente fagolisossomal hidrolítico (Fréhel et al, 1986).

É hoje conhecido que o abaixamento do pH no fagossoma não é necessariamente consequência da sua fusão com o lisossoma, podendo ocorrer previamente à fusão, embora a acidificação seja precedida por uma rápida e passageira alcalinização do interior fagossomal após a fagocitose (Segal et al, 1981). É provável que o abaixamento do pH observado se deva: (i) à existência no fagossoma de uma bomba de prótons adenosina trifosfatase (ATPase), semelhante à encontrada em vesículas endocíticas (Mellman et al, 1986); (ii) à actividade da enzima NADPH-oxidase, interveniente no metabolismo oxidativo do macrófago, que forma anião superóxido e liberta iões  $H^+$  para o fagossoma (Sibley et al, 1985).

A acidificação do compartimento intracelular onde o parasita se encontra poderá ter consequências muito importantes para o controlo do crescimento de vários microrganismos pelos macrófagos. A não acidificação do fagossoma pode aumentar a sobrevivência dos microrganismos, devido aos factores seguintes, entre outros: (i) diminuição na actividade



hidrolítica das enzimas lisossomais; (ii) deficiências na actividade fusiogénica do fagossoma e/ou lisossoma; (iii) deficiente transporte de drogas antimicrobianas para o compartimento celular onde o microrganismo se encontra, por alteração da normal capacidade de fusão do fagossoma com vesículas pinocíticas; (iv) deficiente processamento antigénico; (v) impossibilidade de formação de ROI com toxicidade aumentada, como por exemplo, o ácido conjugado do anião superóxido (Eissenberg et al, 1993; Klebanoff, 1985).

Com efeito, está descrito que vários microrganismos impedem a acidificação do fagossoma, designadamente *Nocardia asteroides* (Black et al, 1986), *Histoplasma capsulatum* (Eissenberg et al, 1993), *Toxoplasma gondii* e *Legionella pneumophila* viáveis (Sibley et al, 1985; Horwitz e Maxfield, 1984), *M. tuberculosis* e *M. avium* viáveis e virulentos (Crowle et al, 1991). Appelberg e Orme demonstraram existir uma correlação entre a actividade micobacteriostática induzida pelo IFN- $\gamma$  e a acidificação fagossomal (Appelberg e Orme, 1993). Ainda não está esclarecido o processo pelo qual estes microrganismos interferem com a acidificação normal do fagossoma, embora muito provavelmente eles alterem a actividade normal da bomba de prótons ATPase ou da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido (NADPH) oxidase (Sibley et al, 1985; Eissenberg et al, 1993).

A citocina IFN- $\gamma$  promove a acidificação de fagolisossomas, aumentando assim a actividade microbicida contra a levedura *Candida albicans* (Watanabe et al, 1991).

No entanto, outros microrganismos existem que conseguem sobreviver e multiplicar-se no interior fagolisossomal acidificado como é o caso do protozoário *Leishmania amazonensis* (Antoine et al, 1990), da bactéria *Coxiella burnetti* (Hackstadt e Williams, 1981) e da micobactéria *M. lepraemurium* (D'Arcy Hart et al, 1972).

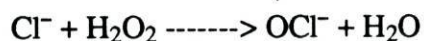
Dos vários parâmetros que podem ser estudados na activação do macrófago, a secreção de ROI e de RNI tem merecido especial atenção na literatura, uma vez que estes compostos estão implicados na actividade microbiostática/microbicida contra variados

microrganismos (Haidaris e Bonventre, 1982; Murray et al, 1985; Langermans et al, 1992; Boockvar et al, 1994).

A secreção de ROI pode ocorrer em macrófagos ou em granulócitos neutrófilos, tendo sido descrita nos granulócitos em primeiro lugar (Homan-Müller et al, 1975; DeChatelet et al, 1975). Os acontecimentos do metabolismo oxidativo que conduzem à secreção dos ROI pelos fagócitos, iniciam-se após o contacto do microrganismo com a célula do hospedeiro. A ocupação de receptores da membrana plasmática do fagócito fornece o estímulo iniciador deste processo (Forman e Thomas, 1986). Após a ocupação de receptores ocorre uma despolarização da membrana plasmática, que poderá estar relacionada com um influxo de iões  $\text{Na}^+$ , o qual despoletará um subsequente influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode iniciar o ciclo do inositol fosfato e ser responsável pela fosforilação de proteínas através da activação da proteína cinase. Após activação das células fagocíticas por acetato mirístico de forbol (PMA), ocorre uma activação directa da proteína cinase C, aumentando a afinidade da enzima para o  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, a activação desta proteína cinase pode ser o ponto comum da estimulação do metabolismo oxidativo por vários agentes (Forman e Thomas, 1986). Em consequência destas reacções intracelulares, é activada uma oxidase que transfere electrões da molécula de NADPH para o  $\text{O}_2$ . Os fagócitos produzem, então, anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). À formação de anião superóxido seguir-se-á, muito provavelmente, a sua dismutação em peróxido de hidrogénio e oxigénio. Esta reacção é catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Existem diferentes enzimas SOD que diferem no seu componente metálico: cobre-zinco, manganésio ou ferro. Os procariontes possuem SOD contendo ferro ou manganésio, e os eucariontes possuem SOD contendo cobre-zinco no citoplasma e manganésio nas mitocôndrias. A redução subsequente do peróxido de hidrogénio resulta na formação do radical hidroxilo, o qual é altamente reactivo. O mecanismo desta reacção foi proposto por Haber e Weiss em 1934. No metabolismo oxidativo pode também ocorrer síntese de oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), quando a absorção de

energia muda um dos electrões desemparelhados do oxigénio para uma orbital de energia superior, com inversão de spin. O mecanismo clássico para a formação do oxigénio singleto é a interacção de hipoclorito e peróxido de hidrogénio em pH alcalino. No entanto, outras reacções de formação de oxigénio singleto podem ocorrer, como sejam dismutação espontânea, reacção com  $\text{OH}^\cdot$ , reacção com diacilperóxidos, e reacção com peróxido de hidrogénio (Hughes, 1988; Klebanoff, 1985).

Todos estes intermediários podem reagir com moléculas biológicas. O anião superóxido e o seu ácido conjugado ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) reagem com várias moléculas biologicamente importantes, sendo o  $\text{HO}_2^\cdot$  bastante mais reactivo do que a sua base conjugada,  $\text{O}_2^-$ . Entre as moléculas biológicas que reagem com estes radicais contam-se a cisteína, o ácido ascórbico, o NADH ligado a enzimas e ácidos gordos polinsaturados (Forman e Thomas, 1986). O peróxido de hidrogénio que se forma por dismutação do superóxido pode ser directamente bactericida ou ser convertido num oxidante mais potente (hipohaletto), reagindo com um haleto. Uma vez que nas células se encontra  $\text{Cl}^-$  em abundância, geralmente ocorre a formação de hipoclorito a partir de cloreto. No neutrófilo e no monócito, esta reacção é catalizada pela enzima mieloperoxidase (MPO):



O macrófago, onde a MPO está ausente, pode obter esta enzima fagocitando o neutrófilo no local da inflamação (Silva et al, 1989); alternativamente, a enzima catalase existente nos macrófagos pode actuar como peroxidase, catalizando a reacção do haleto com o peróxido de hidrogénio (Klebanoff, 1985). O hipoclorito, reagindo com grupos amina, leva à formação de cloraminas, as quais são agentes bactericidas de vida longa, podendo esta actividade dever-se à oxidação de grupos SH da bactéria. O radical hidróxilo pode estar envolvido em reacções de peroxidação lipídica, despolimerização de proteínas e degradação de DNA (Forman e Thomas, 1986).

Embora esteja bem estabelecida a importância dos ROI na actividade microbicida dos macrófagos para vários microrganismos (Haidaris e Bonventre, 1982; Murray et al, 1985; Nathan et al, 1979; Sasada e Johnston, 1980), a sua importância na actividade micobacteriostática, é variável. De facto, *M. microti* é susceptível ao peróxido de hidrogénio (Walker e Lowrie, 1981) o qual desempenha um papel importante na actividade microbicida de macrófagos peritoneais de ratinho para esta bactéria (Walker e Lowrie, 1981). Os ROI também estão envolvidos no controlo do crescimento de *M. bovis* BCG, estirpe Pasteur, por macrófagos alveolares de cobaias previamente infectados com esta micobactéria (Lagranderie et al, 1991). Porém, os radicais de oxigénio não parecem estar envolvidos na restrição do crescimento de outras espécies como *M. bovis* e *M. tuberculosis*, dentro de macrófagos de ratinho (Flesch e Kaufmann, 1988; Chan et al, 1992; Jackett et al, 1980). Na capacidade de macrófagos derivados da medula óssea (BMMØ) de ratinho controlarem o crescimento de *M. bovis* (estirpe Phibbs), não parece que os ROI tenham um papel importante, uma vez que a adição de inibidores destes radicais a culturas de BMMØ não afectou a capacidade micobacteriostática induzida pelo IFN- $\gamma$  (Kaufmann e Flesch, 1990). Existe evidência de que *M. tuberculosis* e *M. leprae* podem impedir a geração do metabolismo oxidativo do macrófago por realizar a sua entrada nestes fagócitos via receptores de complemento (Wright e Silverstein, 1983; Birdi e Antia, 1989). Alguns glicolípidos micobacterianos podem interferir com o metabolismo oxidativo do macrófago (Chan et al, 1989), como por exemplo, o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), pertencente a *M. leprae* (Birdi e Antia, 1989).

Os radicais de oxigénio não parecem desempenhar um papel importante na bacteriostase de *M. avium* virulento induzida pelo IFN- $\gamma$  em BMMØ (Appelberg e Orme, 1993). No entanto, está descrito na literatura que, para várias estirpes de *M. avium* testadas, a variante SmOp (de baixa virulência) induz uma maior intensidade de quimioluminescência (um indicador do metabolismo oxidativo do macrófago) do que a variante SmTr (de alta virulência), em macrófagos de ratinho infectados *in vitro* (Saito e Tomioka, 1990; Tomioka e Saito, 1993). Nesta capacidade aumentada de induzir a produção de ROI da variante SmOp,

pode estar envolvido um componente de natureza lipídica e proteica, e também glícidos contendo ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 ou  $\beta$ -1,4. Também está descrito que estirpes menos virulentas de *M. intracellulare* induzem uma maior produção de superóxido do que estirpes mais virulentas, sugerindo que os ROI podem estar envolvidos na restrição do crescimento de estirpes de baixa virulência (Gangadharam e Edwards III, 1984).

Até há poucos anos, o único mecanismo bioquímico indutível que explicava a citotoxicidade dos macrófagos ativado era a síntese de ROI pela enzima NADPH oxidase. Em 1987, foi descrita a produção de óxido nítrico (NO) e citrulina a partir do aminoácido L-arginina por uma enzima denominada óxido nítrico sintetase (ONS) (Hibbs et al, 1987; Iyengar et al, 1987). A biossíntese de NO pode levar à produção de outros radicais de azoto (RNI), incluindo iões nitrosónio ( $\text{NO}^+$ ) e nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ), dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), nitrito, nitrato e S-nitrosotióis (Bastian e Hibbs, 1994; Stamler et al, 1992). Por sua vez, o aminoácido citrulina pode ser convertido em L-arginina por macrófagos ativado, aumentando a disponibilidade deste aminoácido nas células e favorecendo a produção aumentada de NO pelos macrófagos (Wu e Brosnan, 1992; Norris et al, 1995).

Existem três isoformas geneticamente distintas da enzima ONS: uma isoforma constitutiva, de baixo rendimento, presente em células endoteliais que regula o tono vascular, uma isoforma constitutiva, de baixo rendimento, presente nos neurónios e que modula a plasticidade sináptica e uma isoforma indutível por mecanismos imunes e inflamatórios, de alto rendimento, que funciona como um componente efector da resposta imune celular (Bastian e Hibbs, 1994). A ONS imune/inflamatória pode ser induzida por citocinas em quase todas as células somáticas nucleadas, incluindo hepatócitos, células endoteliais, fibroblastos, células do tecido vascular liso e células efectoras envolvidas na resposta imune celular.

O NO pode reagir com o oxigénio ou com o superóxido, e forma com facilidade complexos com iões metálicos de transição, incluindo os normalmente encontrados em metaloproteínas contendo um grupo heme, como a hemoglobina, podendo também reagir com grupos ferro-enxofre presentes em certas proteínas como as envolvidas na cadeia respiratória e existentes na mitocôndria, ou algumas enzimas como a aconitase (Stamler et al, 1992). O  $\text{NO}^+$  é reactivo com compostos aromáticos e bases, incluindo peróxido de hidrogénio. O  $\text{NO}^-$  reage com iões metálicos e grupos sulfidrilo (Stamler et al, 1992).

Os RNI estão envolvidos em mecanismos de citotoxicidade como a lise não específica de células tumorais (Hibbs et al, 1987), a indução da apoptose em macrófagos (Albina et al, 1993), e também a capacidade microbiostática/microbicida do macrófago de ratinho contra vários parasitas, como *Schistosoma mansoni* (James e Glaven, 1989), *Trypanosoma cruzi* (Norris et al, 1995), *Plasmodium falciparum* (Rockett et al, 1991), *Leishmania* sp. (Mauël et al, 1991), *Toxoplasma gondii* (Langermans et al, 1992), bactérias como *Francisella tularensis* (Fortier et al, 1992) e *Listeria monocytogenes* (Bermudez, 1993b), e fungos como *Cryptococcus neoformans* (Cameron et al, 1990). Algumas referências encontradas na literatura indicam que macrófagos humanos não produzem quantidades apreciáveis de RNIs nem estes radicais parecem estar envolvidos na actividade antimicrobiana de macrófagos humanos (Bermudez, 1993b; Cameron et al, 1990). Porém, há também dados contrários a estes que demonstram a produção de NO nessas células (Denis, 1991a; Dumarey, 1994).

Os RNI parecem desempenhar um papel antimicobacteriano importante contra algumas micobactérias, embora o crescimento de outras não seja afectado por estas moléculas. Assim, os RNI estão envolvidos na restrição do crescimento, em macrófagos murinos, de *M. tuberculosis*, estirpe Erdman (Chan et al, 1992), e de *M. bovis* BCG, estirpe Phipps (Flesch e Kaufmann, 1991). No entanto, os RNI não parecem ter importância fundamental na bacteriostase de macrófagos murinos peritoneais para *M. fortuitum* (Nibbering et al, 1994) e em relação ao *M. avium*, aparecem na literatura referências contraditórias. De facto, após o estudo de três estirpes pertencentes ao MAC, Doi et al

verificaram que a estirpe de *M. avium* estudada (estirpe Mino) era sensível ao NO produzido por macrófagos de rato, enquanto que as outras duas estirpes de *M. intracellulare* eram resistentes. Além disso, uma estirpe de *M. intracellulare* era boa estimuladora da produção de NO, e esta molécula, não limitando o seu crescimento, demonstrou suprimir a sua fagocitose, o que poderá contribuir ainda mais para a disseminação extracelular desta micobactéria (Doi et al, 1993). Denis, estudando o crescimento de duas estirpes de *M. avium*, uma virulenta e outra não virulenta, em macrófagos humanos, verificou que a actividade bactericida destes macrófagos em relação à estirpe avirulenta era dependente da produção de RNI, mas estes radicais não afectavam a bacteriostase observada nos macrófagos em relação à estirpe virulenta, após tratamento com TNF- $\alpha$  (Denis, 1991a). Ainda em relação à infecção em macrófagos humanos, está também descrito que bacilos vivos de uma estirpe virulenta de *M. avium* são capazes de induzir a formação de NO nestas células; no entanto, adicionando aos macrófagos infectados um inibidor da produção de NO, não se verificou um aumento significativo do crescimento bacteriano intramacrofágico (Dumarey et al, 1994). Em trabalho realizado no nosso laboratório, também ficou demonstrada a falta de associação entre a virulência de duas variantes pertencentes à estirpe de *M. avium* estudada e a sua capacidade de induzir a produção de RNI em BMM $\emptyset$  de ratinho (Appelberg e Orme, 1993), assim como foi demonstrado que os RNI não participam na bacteriostase induzida pelo IFN- $\gamma$ , de uma estirpe virulenta (estirpe 25291, também utilizada no presente trabalho de Doutoramento) (Appelberg e Orme, 1993).

Tomando todos estes dados em conjunto, poderei sugerir que os RNI não parecem estar envolvidos na restrição do crescimento de estirpes virulentas de *M. avium*, não ficando de parte a hipótese de estarem envolvidos na eliminação de estirpes avirulentas.

Numerosas proteínas, péptidos e ácidos orgânicos com actividade antimicobacteriana têm sido isolados de tecidos e fluidos corporais não sendo, no entanto, certa a sua relevância para o destino das micobactérias no interior dos macrófagos (Lowrie, 1983). As proteínas e

lípidos antimicobacterianos tendem a ser de carácter básico e a adsorverem a grupos acídicos na superfície bacteriana onde, presumivelmente, interferem com o transporte de metabolitos. O ácido láctico é letal para as micobactérias e a sua acumulação como produto do metabolismo mesmo em macrófagos em meio aeróbio em condições de estimulação crónica, pode contribuir para a morte dos bacilos. Os ácidos gordos tanto podem ser utilizados como nutrientes, como serem potencialmente tóxicos, dependendo do comprimento da cadeia carbonada, grau de insaturação e pH (Lowrie e Andrew, 1988).

Compostos presentes na parede celular de algumas espécies de micobactérias parecem inibir a capacidade microbicida do macrófago. De facto, o LAM, para além de ser altamente imunogénico como foi referido atrás, interage directamente com células do sistema imune possivelmente modificando a expressão da resistência adquirida à infecção micobacteriana. Essas modificações envolvem a inibição da blastogénese de linfócitos T (Kaplan et al, 1987; Moreno et al, 1988), provavelmente como resultado da secreção de grandes quantidades de TNF pelos macrófagos (Moreno et al, 1989; Wallis et al, 1990), a interferência na activação do macrófago mediada pelo IFN- $\gamma$  (Sibley et al, 1988) e a inibição dos ROI produzidos pelos macrófagos infectados (Chan et al, 1989). Foi também descrito que o LAM de uma estirpe avirulenta de *M. tuberculosis* (a estirpe H37Ra) demonstrou ser 100 vezes mais potente a induzir a secreção de TNF- $\alpha$  de BMM $\emptyset$  de ratinho do que uma estirpe virulenta (a estirpe Erdman) (Chatterjee et al, 1992). Este resultado implica que a capacidade do LAM produzido por uma dada estirpe de *M. tuberculosis* para induzir a secreção de TNF- $\alpha$  pelo macrófago infectado pode influenciar directamente a sobrevivência e multiplicação do microrganismo no interior dessa célula do hospedeiro.

Outros componentes das micobactérias são capazes de interferir com as funções macrofágicas. De facto, uma glicoproteína de 25-kDa isolada de *M. tuberculosis* é capaz de inibir a capacidade microbicida de monócitos humanos contra *Staphylococcus aureus*, assim como a fusão fagolisossomal, a secreção de lisozima, e a produção de ROI, em monócitos e



granulócitos humanos (Wadee e Clara, 1989; Wadee, 1990). IFN- $\gamma$  e clofazimina (uma droga anti-lepra conhecida pela sua capacidade de activar o macrófago) adicionados antes ou simultâneamente à glicoproteína (mas não após), demonstraram ser capazes de reverter o efeito referido. Também o PGL-1 pertencente a *M. leprae* actua como inibidor dos ROI, podendo assim proteger a micobactéria no interior da célula fagocítica (Neill e Klebanoff, 1988).

Glicopeptidolípidos pertencentes ao MAC podem causar imunossupressão e inibir a proliferação de linfócitos murinos (Brownback e Barrow, 1988). Os mecanismos pelos quais estes componentes actuam são ainda desconhecidos.

### **3.5. As citocinas na infecção por *M. avium***

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que podem ter a sua origem em diferentes tipos de células e que são responsáveis pela concretização de várias funções, como o controlo da acção das células do sistema imune (ex: linfocinas), a activação da defesa imune e das actividades citotóxicas (ex: interferões) e a diferenciação e crescimento de células hematopoiéticas, epiteliais ou mesenquimatosas (ex: factores de crescimento) (Wardle, 1993). De certa forma, as citocinas podem ser consideradas como palavras na comunicação intercelular, constituindo, no seu conjunto, parte da linguagem do sistema imunológico (Nacy et al, 1990). Todas as citocinas partilham quatro propriedades importantes: são pleiotrópicas (uma citocina pode desempenhar diferentes funções), são redundantes (diferentes citocinas são capazes de partilhar uma mesma função), apresentam efeitos sinérgicos entre si (a actividade de uma citocina é aumentada pela presença de uma segunda citocina), e cooperam entre si (em muitas situações, uma citocina não exerce o seu efeito se não se encontrar na presença de outras) (Nacy et al, 1990).

Nesta dissertação serão apenas focados aspectos relacionados com as citocinas envolvidas no controlo da infecção por micobactérias e, fundamentalmente, no controlo da infecção por *M. avium*.

a) Factor de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e monócitos, podendo ser, também, secretada por outras células incluindo células B, células T, células NK, células da glia e adipócitos (Tracey e Cerami, 1993). Esta citocina interfere com a função de muitos tipos celulares, e é um mediador da inflamação e da resposta imune celular (Bonta et al, 1991; Kindler et al, 1989; Ohmori et al, 1993; Tracey e Cerami, 1993).

O TNF- $\alpha$  desempenha um importante papel na regulação da actividade microbicida dos macrófagos contra vários microrganismos, como *Toxoplasma gondii* (Langermans et al, 1992), *Listeria monocytogenes* (Rothe et al, 1993), *Pneumocystis carinii* (Chen et al, 1992) e *Salmonella typhimurium* (Tite et al, 1991). Na infecção por micobactérias o TNF- $\alpha$  é, também, importante: (i) pode contribuir para uma resposta imune protectora na infecção humana por *M. leprae*, embora, quando produzido em excesso, possa também ter efeitos indesejáveis, como no eritema nodoso leproso (Barnes et al, 1992); (ii) a infusão de TNF- $\alpha$  em ratinhos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv aumenta a sua resistência à infecção, durante a fase inata, ou seja, quando ainda não ocorreu uma resposta T-dependente (Denis, 1991b); (iii) o tratamento de ratinhos com anti-TNF- $\alpha$  na infecção por *M. tuberculosis* H37Rv, diminui consideravelmente a capacidade de sobrevivência dos animais, estando esta capacidade também diminuída se a infecção for estabelecida em ratinhos "knock out" para o gene codificante do receptor de TNF- $\alpha$  de 55 kDa (Flynn et al, 1995); (iv) a presença de

TNF- $\alpha$  no fígado de ratinhos infectados com *M. bovis* BCG induz o aparecimento e manutenção de granulomas capazes de actividade bactericida (Kindler et al, 1989).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina com uma importante actividade no controlo da infecção por *M. avium*, quer *in vitro*, quer *in vivo*. De facto, macrófagos alveolares humanos tratados com TNF- $\alpha$  apresentaram actividade bacteriostática contra uma estirpe de *M. intracellulare*, membro do MAC (Suzuki et al, 1994). O tratamento com TNF- $\alpha$  de macrófagos derivados do sangue periférico humano diminuiu substancialmente o crescimento de uma estirpe virulenta *M. avium* nestas células (Denis e Gregg, 1990), e induziu actividade bactericida para duas estirpes de virulência diferente (*M. avium* 101 e *M. avium* 100) (Bermudez e Young, 1988). Bermudez demonstrou também a importância do tratamento com TNF- $\alpha$  (e IL-2) de ratinhos infectados *in vivo* com *M. avium* 101, no controlo desta infecção (Bermudez et al, 1989). Denis realizou experiências de cinética de crescimento *in vivo* de uma estirpe de *M. avium* virulenta (TMC 702) em ratinhos susceptíveis, e demonstrou que a adição de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  potenciou a infecção, enquanto que a adição de TNF- $\alpha$  recombinante (rTNF- $\alpha$ ) originou uma diminuição do número de unidades formadoras de colónias quer no fígado quer no baço dos ratinhos (Denis, 1991c). Estes efeitos foram evidentes dos 20 aos 100 dias de infecção. Appelberg et al demonstraram a importância do TNF- $\alpha$  na resistência inata à infecção *in vivo* por *M. avium* 2447 no ratinho, e que TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  actuam de forma sinérgica ou aditiva (Appelberg et al, 1994).

Existem referências na literatura sobre a indução da produção de TNF- $\alpha$  no macrófago por micobactérias. Com efeito, está descrito que *M. leprae* induz a produção desta citocina em células mononucleares do sangue periférico de doentes com lepra (Barnes et al, 1992), e que o LAM de *M. tuberculosis* induz a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais inflamatórios de ratinho, obtidos após injeção de caseína, e de BMM $\emptyset$  murinos (Chatterjee et al, 1992). Foi também descrito que diferentes estirpes de *M. avium* estimulam, a diferentes níveis, a produção de TNF- $\alpha$  por BMM $\emptyset$  murinos (Furney et al, 1992) e

macrófagos humanos (Fattorini et al, 1994). Os responsáveis por esta indução poderão ser os antígenos GPL ou, como sugerido por Furney et al, as moléculas de LAM, as quais estão também presentes no *M. avium* (Furney et al, 1992).

Os mecanismos pelos quais o TNF- $\alpha$  exerce a sua acção micobacteriostática/micobactericida, não são ainda claros. Assim, para as micobactérias, nomeadamente na infecção de macrófagos *in vitro* por *M. avium*, poderão estar envolvidos diferentes mecanismos, que dependem da espécie ou estirpe infectante: (i) a restrição do crescimento de *M. avium* 7497 (estirpe virulenta) e a destruição dos bacilos *M. avium* LR 149 (estirpe não virulenta) por macrófagos estimulados por TNF- $\alpha$  e GM-CSF são dependentes da produção de RNI (Denis, 1991a); (ii) Bermudez, trabalhando com a estirpe *M. avium* 101, demonstrou que o efeito micobacteriostático induzido pelas citocinas TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IFN- $\gamma$  era independente da produção de RNI (Bermudez, 1993b); (iii) no nosso laboratório, também não se encontrou associação da acção do TNF- $\alpha$  ao papel dos RNI, para as estirpes estudadas (*M. avium* 25291 e 1983) (Appelberg e Orme, 1993; artigo 4, desta dissertação); (iv) embora Bermudez (Bermudez e Young, 1988) e Denis (Denis, 1991a) refiram que a bacteriostase dependente do TNF- $\alpha$  é independente da produção de ROI, o mesmo não acontece com estirpes diferentes (artigo 4, desta dissertação).

Algumas citocinas potenciam os efeitos do TNF- $\alpha$  ou induzem a sua síntese, enquanto que outras têm um efeito contrário. No primeiro grupo incluem-se a interleucina-1 (IL-1) e o IFN- $\gamma$  (Tracey e Cerami, 1993). De facto, a produção de IL-1 é induzida pelo TNF- $\alpha$ , e aquela citocina apresenta propriedades pró-inflamatórias semelhantes ao TNF- $\alpha$  (Bonta et al, 1991). Está também descrito que a injeção de IL-1 e TNF- $\alpha$ , conjuntamente, em ratinhos infectados com *M. avium* resultou num efeito bactericida aumentado, no baço e no fígado, comparativamente à injeção de apenas TNF- $\alpha$  (Denis, 1991c). O IFN- $\gamma$  actua sinergisticamente com o TNF- $\alpha$  na indução de actividade micobacteriostática contra *M. tuberculosis* (Flesch e Kaufmann, 1990), e *M. avium* (Appelberg e Orme, 1993) e na

produção de RNI (Drapier et al, 1988; Appelberg e Orme, 1993). Também a interleucina-2 (IL-2) demonstrou um sinergismo com TNF- $\alpha$  na indução de resistência à infecção *in vivo* por *M. avium* em ratinhos susceptíveis (Bermudez et al, 1989).

Pelo contrário, a incubação com interleucina-10 (IL-10) (Moore et al, 1993), ou com interleucina-4 (IL-4) (Sone et al, 1992), inibe a subsequente secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, e a interleucina-6 (IL-6), que pode ser induzida nos macrófagos por IL-1 e TNF- $\alpha$ , impede a activação macrofágica pelo TNF- $\alpha$ , possivelmente por causar uma redução da expressão dos receptores para esta citocina na membrana daqueles fagócitos (Bermudez et al, 1992). O TGF- $\beta$  suprime a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos e impede a activação destas células por citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  (Bermudez, 1993a). Está descrito que a infecção *in vitro* por *M. avium* induz a secreção de IL-6 e TGF- $\beta$  nos macrófagos (Bermudez et al, 1992; Bermudez, 1993a), o que poderá ter como consequência uma menor capacidade de activação dos macrófagos infectados. Em trabalho mais recente, foi demonstrada a indução da síntese destas citocinas durante a infecção *in vivo* de ratinhos com *M. avium*, e a inibição da expressão de receptores para o TNF- $\alpha$  ao longo da infecção, o que poderá estar relacionado com a indução precoce de TGF- $\beta$  (Champsi et al, 1995).

#### b) Interferão-gama (IFN- $\gamma$ )

O IFN- $\gamma$  é uma linfocina produzida fundamentalmente por células T e NK, cuja produção pode ser induzida após exposição das células a mitogénios ou a antigénios microbianos. Esta citocina constitui um mediador importante da activação macrofágica na infecção por muitos microrganismos parasitas intracelulares, como *Listeria monocytogenes* (Denis e Gregg, 1991), *Francisella tularensis* (Anthony et al, 1992), *Toxoplasma gondii* (Beaman et al, 1992), *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (Bogdan et al, 1993).

Na infecção por micobactérias, o IFN- $\gamma$  desempenha também um importante papel. De facto, esta citocina induz a micobacteriostase de *M. tuberculosis*, estirpe H37Rv, quando adicionada a macrófagos de ratinho antes da sua infecção (Flesch e Kaufmann, 1987; Rook et al, 1986a). O IFN- $\gamma$  apresenta também um efeito micobacteriostático importante na infecção murina *in vitro* por *M. bovis* BCG, se adicionado a macrófagos residentes peritoneais (Sypek et al, 1993), ou a BMM $\emptyset$  (Flesch e Kaufmann, 1990), previamente à infecção. Em trabalho mais recente desenvolvido por dois grupos trabalhando com animais "knock-out" para o gene que codifica o IFN- $\gamma$  (GKO), foi demonstrado que esta citocina está também envolvida no controlo da infecção *in vivo* por *M. tuberculosis*, estirpe Erdman, no ratinho (Flynn et al, 1993; Cooper et al, 1993). No entanto, surgem também na literatura dados contraditórios: (i) Douvas et al, trabalhando com *M. tuberculosis* estirpe Erdman, referem que, quando IFN- $\gamma$  é adicionado a macrófagos humanos do sangue periférico cultivados *in vitro*, há uma potenciação do crescimento bacteriano, sendo este efeito dependente da dose (Douvas et al, 1985); (ii) o IFN- $\gamma$  demonstrou ser bacteriostático quando adicionado a macrófagos residentes peritonreais (RPM $\emptyset$ ) de ratinho, mas não a monócitos ou macrófagos derivados do sangue periférico humano, quando infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (Rook et al, 1986a); (iii) o crescimento de *M. tuberculosis* Middelburg em BMM $\emptyset$  murinos não é afectado pela incubação destes macrófagos com IFN- $\gamma$  (Flesch e Kaufmann, 1987).

Assim, pode-se sugerir que os macrófagos humanos não parecem responder tão eficazmente ao IFN- $\gamma$  como os macrófagos murinos e também que diferentes estirpes de *M. tuberculosis* apresentam diferente sensibilidade aos efeitos produzidos no macrófagos por esta citocina.

O papel do IFN- $\gamma$  na infecção por *M. avium* apresenta-se, também, algo contraditório. De facto, Denis e Gregg, trabalhando com uma estirpe virulenta de *M. avium*, referem que esta apresenta um crescimento *in vitro* semelhante quer na ausência quer na presença de IFN- $\gamma$ , quando este é adicionado 6 horas antes da infecção a RPM $\emptyset$  de ratinho (Denis e Gregg, 1991). No entanto, após adição de indometacina aos macrófagos infectados,

estes ganham alguma capacidade bacteriostática, sugerindo que as prostaglandinas podem estar envolvidas na ausência de resposta ao IFN- $\gamma$ . Toba et al também demonstram que o IFN- $\gamma$  não está envolvido na bacteriostase de várias estirpes de *M. avium* por monócitos do sangue periférico humano (Toba et al, 1989). Noutro trabalho, utilizando monócitos do sangue periférico humano, o IFN- $\gamma$ , quando adicionado 2 dias antes da infecção, diminuiu a fagocitose das 4 estirpes de *M. avium* estudadas (2 delas isoladas de doentes com SIDA), mas quando esta citocina foi adicionada logo após a infecção, foi evidente um ligeiro efeito bacteriostático (Shiratsuchi et al, 1990).

Em trabalho realizado no nosso laboratório, foi constatada grande variação na capacidade do IFN- $\gamma$  induzir bacteriostase em BMM $\phi$  de ratinho, infectados por diferentes estirpes de *M. avium*, encontrando-se estirpes resistentes à acção daquela citocina, e estirpes susceptíveis (Appelberg e Orme, 1993). No entanto, esta citocina, adicionada logo após a infecção (assim como TNF- $\alpha$  e GM-CSF), induziu uma marcada bacteriostase para uma das estirpes estudadas (estirpe 25291). Em outro trabalho realizado por Appelberg et al foi demonstrado que na infecção *in vivo* de ratinhos susceptíveis com *M. avium* 2447, tanto IFN- $\gamma$  como TNF- $\alpha$  desempenham um importante papel na resposta inata e que o IFN- $\gamma$  é também importante na resposta imune adquirida (Appelberg et al, 1994). Denis obteve resultados idênticos, estudando a infecção murina por *M. tuberculosis* H37Rv (Denis, 1991b). Castro et al, também referem a importância da produção de IFN- $\gamma$  no controlo da infecção *in vivo* por *M. avium*, uma vez que a produção desta citocina aumentou mais em ratinhos infectados com a estirpe de baixa virulência estudada (estirpe 2447), do que em ratinhos infectados com a estirpe de alta virulência (estirpe 25291) (Castro et al, 1995a).

A bacteriostase induzida pelo IFN- $\gamma$  nos macrófagos infectados com *M. avium* pode depender de vários factores, nomeadamente a população de macrófagos, o tempo da adição da citocina e a estirpe bacteriana. O facto de o IFN- $\gamma$  não induzir bacteriostase para todas as estirpes de *M. avium* pode dever-se à capacidade de algumas estirpes de *M. avium*

induzirem nos macrófagos a produção de TGF- $\beta$ , o qual é um inibidor da activação do macrófago por outras citocinas (Bermudez, 1993a).

Embora o papel do IFN- $\gamma$  na actividade antitumoral e antimicrobiana seja bem reconhecido desde há alguns anos, os mecanismos pelos quais ele actua não se encontram ainda totalmente esclarecidos. Com efeito, ao activar os macrófagos, esta citocina induz um certo número de possíveis vias antimicrobianas, como o aumento da secreção de ROI (Hughes, 1988) e a secreção de RNI (Green et al, 1990). Para algumas infecções, a(s) via(s) responsável(eis) pela actividade antimicrobiana do IFN- $\gamma$  foram identificadas; porém, para outras, o mecanismo exacto de actuação da citocina não é ainda claro. Trabalho realizado utilizando *M. bovis* BCG demonstrou que a bacteriostase induzida pelo IFN- $\gamma$  em BMM $\emptyset$  murinos era independente da produção de ROI (Flesch e Kaufmann, 1988). Estes mesmos autores relacionam a bacteriostase para *M. bovis* BCG dependente do IFN- $\gamma$  com a produção de RNI (Flesch e Kaufmann, 1991).

Na infecção por *M. avium* 25291, Appelberg e Orme demonstraram que a bacteriostase devida ao IFN- $\gamma$  não depende da produção de ROI nem da produção de RNI, mas parece estar associada com um controlo da acidificação fagossomal (Appelberg e Orme, 1993). Também Bermudez não encontrou associação entre o controlo do crescimento bacteriano de *M. avium* 101 induzido pelo IFN- $\gamma$  e a produção de RNI (Bermudez, 1993b). No entanto, Doi, trabalhando com três estirpes de MAC (uma de *M. avium* e duas de *M. intracellulare*), verificou que a bacteriostase dependente do IFN- $\gamma$  em macrófagos alveolares de rato para a estirpe de *M. avium* (estirpe Mino) era dependente da produção de RNI (Doi, 1993).



### c) Outras citocinas

Um número cada vez mais crescente de citocinas tem vindo a ser identificado nos últimos anos, sendo estas moléculas implicadas em diferentes processos inflamatórios e imunitários. Neste subcapítulo referirei alguns dados sobre outras citocinas, além das referidas acima, que desempenham um papel importante na infecção por *M. avium*, quer esse papel seja exacerbador ou controlador desta mesma infecção.

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina secretada por uma grande variedade de células, incluindo monócitos ou macrófagos, células NK, células endoteliais, neutrófilos e células T (Stevens, 1995). É um importante mediador da inflamação, lesão tecidual e reacções imunológicas (van der Meer e Vogels, 1991). Existem duas formas, IL-1a (geralmente associada à membrana) e IL-1b (geralmente secretada), que partilham o mesmo receptor. Na infecção *in vitro* de monócitos humanos por *M. avium*, a IL-1b está referida como uma citocina exacerbadora do crescimento de uma estirpe virulenta (*M. avium* TMC 7479) (Denis, 1991d). Pelo contrário, em trabalho posterior com uma estirpe diferente de *M. avium* (estirpe B101), a qual é virulenta *in vitro*, apresentando virulência intermédia *in vivo*, o mesmo autor descreve que embora a IL-1b não apresente nenhum efeito na infecção *in vitro* de macrófagos residentes peritoneais, esta citocina está envolvida na resistência à infecção murina *in vivo*. Com efeito, a produção de IL-1 (a e b) demonstrou ser elevada durante a infecção por *M. avium* nos órgãos estudados (baço, fígado e pulmão), apresentando o pulmão os valores mais altos. A injeção de ratinhos com o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), um inibidor competitivo da IL-1, provocou um aumento do crescimento de *M. avium*, em todos os órgãos estudados (Denis e Ghadirian, 1994). No pulmão, onde o efeito

do IL-1ra foi mais evidente, o maior crescimento bacteriano observado foi relacionado com uma diminuição considerável do número de neutrófilos (Denis e Ghadirian, 1994).

A interleucina-2 (IL-2) é sintetizada por células T pouco tempo após ligação de um antígeno processado ao receptor do linfócito T. Esta citocina pode ser produzida por células CD4+ ou CD8+, embora as primeiras a produzam em maior quantidade (Stevens, 1995). A IL-2 vai estimular autocrinamente o crescimento e proliferação de linfócitos T específicos e vai estimular a síntese de outras citocinas por estas células, como IFN- $\gamma$  e linfotoxina, estimulando também o crescimento de linfócitos B e de células NK (Stevens, 1995).

Macrófagos esplênicos provenientes de ratinhos infectados *in vivo* com *M. avium* (TMC 724) e cultivados *in vitro* na presença de células T autólogas estimuladas e, conjuntamente, na presença de IL-2 recombinante, são capazes de actividade micobactericida (Hubbard e Collins, 1991). Se aqueles macrófagos forem cultivados apenas em presença dos linfócitos T ou apenas em presença de IL-2 o efeito micobactericida já não se verifica, o que representa um argumento contra a possibilidade de um efeito directo da IL-2 na actividade macrofágica anti-*M. avium* (Hubbard e Collins, 1991). Castro et al descrevem uma secreção aumentada de IL-2 em ratinhos *Bcg<sup>r</sup>* e *Bcg<sup>s</sup>* infectados com *M. avium* de baixa virulência (estirpe 2447), comparativamente ao observado em ratinhos infectados com uma estirpe de alta virulência (estirpe 25291) (Castro et al, 1995a). A neutralização de IL-2 durante a infecção *in vivo* levou a um aumento do crescimento de *M. avium*, principalmente em ratinhos *Bcg<sup>s</sup>* (Castro et al, 1995a). Assim, esta citocina parece ser importante na resistência à infecção por *M. avium*, e embora o seu modo de actuação não seja ainda bem conhecido nesta infecção, é provável que ela seja necessária à diferenciação de linfócitos T.

A Interleucina-4 (IL-4) é predominantemente produzida por linfócitos T "helper" do tipo 2 (ver adiante). Esta citocina tem efeitos variados, incluindo a indução da diferenciação de monócitos em macrófagos, o aumento da expressão de CR3 nestas células, o aumento da expressão de antígenos da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) em células B, monócitos e algumas populações de macrófagos, a indução de actividade anti-tumoral de macrófagos para algumas linhas celulares, a inibição da expressão de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, G-CSF (factor estimulador de colónias granulocíticas) e GM-CSF, e indução de quimiotaxia de macrófagos residentes peritoneais (Te Velde et al, 1988; Stein et al, 1992; Hiester et al, 1992; Hamilton et al, 1992). Para além do acima referido, a IL-4 ainda é capaz de bloquear a proliferação de células T humanas dependente de IL-2 por inibição da expressão dos receptores para a IL-2, de inibir a activação do macrófago causada pelo IFN- $\gamma$  e de bloquear a síntese de RNI e ROI por estas células (Modlin e Nutman, 1993).

Castro et al, estudando a infecção *in vivo* de ratinhos *Bcg<sup>r</sup>* ou *Bcg<sup>s</sup>* por duas diferentes estirpes de *M. avium* já referidas acima (estirpes 2447 e 25291), verificaram o não envolvimento da IL-4 quer no progresso, quer no controlo da infecção (Castro et al, 1995a). Também Appelberg e Orme testaram o efeito da adição de IL-4 a culturas de BMM $\emptyset$  murinos infectados com *M. avium* 25291 (virulenta) e esta adição não causou qualquer efeito no desenvolvimento da infecção *in vitro* (Appelberg e Orme, 1993). Por outro lado, em trabalho realizado com macrófagos peritoneais residentes de ratinho infectados *in vitro* com *M. avium* TMC 702 (virulenta), Denis e Gregg demonstraram que a adição de IL-4 às culturas de macrófagos teve um efeito limitador do crescimento bacilar e a IL-4 apresentou um sinergismo com o IFN- $\gamma$  na indução de bacteriostase (Denis e Gregg, 1991).

A interleucina-6 (IL-6), é produzida por células T, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células neoplásicas (Stevens, 1995). A IL-6 é uma citocina

pró-inflamatória, com actividade não só no sistema imunológico (activação de células T e diferenciação de células B), como também noutros sistemas (indução da resposta de fase aguda, hematopoiese, fisiologia do sistema nervoso central (van Snick, 1990).

A IL-6 não demonstrou estar envolvida na bacteriostase de *M. avium* 25291 por BMMØ murinos cultivados *in vitro* (Appelberg e Orme, 1993). Denis e Gregg, trabalhando com macrófagos humanos do sangue periférico infectados *in vitro* com *M. avium* TMC 7497 (virulenta), demonstraram que a adição de IL-6 às culturas, previamente à infecção, provocou um aumento significativo do crescimento bacteriano (Denis e Gregg, 1990). Porém, ratinhos susceptíveis infectados *in vivo* com *M. avium* 2447 e incubados com anticorpo monoclonal anti-IL-6 permitiram um crescimento bacteriano acentuado nos órgãos estudados (baço e fígado), comparativamente aos ratinhos em que o anticorpo não tinha sido adicionado (Appelberg et al, 1994). No mesmo trabalho foram também estudados ratinhos imunizados com *M. bovis* BCG e infectados, dois meses mais tarde, com *M. avium*. A administração de anti-IL-6 durante a vacinação reduziu a protecção conferida pelo BCG, o que sugere que células T protectoras surgem durante a infecção por *M. avium* em ratinhos, após diferenciação na presença de IL-6.

Enquanto que, *in vitro*, os efeitos exacerbadores da IL-6 na infecção se possam dever, pelo menos em parte, à inibição da activação macrofágica induzida pelo TNF- $\alpha$  (ver acima), *in vivo* outros factores poderão estar em jogo que reduzam a importância desta inibição.

A interleucina-10 (IL-10) é sintetizada principalmente por células T do subtipo Th2 (ver adiante) e macrófagos, em resposta a certos estímulos (ex: LPS) (Stevens, 1995). A estimulação da síntese de IL-10 pelo LPS em macrófagos parece depender da produção de TNF- $\alpha$  por estas células (Wanidworanum e Strober, 1993). A sua síntese é inibida pela IL-4.

Por sua vez, a IL-10 inibe a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, GM-CSF e IFN- $\gamma$  (Moore et al, 1993). Para além destes efeitos, esta citocina também causa uma diminuição da expressão dos antígenos MHC de classe II em macrófagos, a inibição da morte intra e extracelular de parasitas e da produção de ROI por macrófagos, podendo também alterar a resposta T através da inibição do TNF- $\alpha$ , o qual é também um factor de crescimento e diferenciação de linfócitos T (Stevens, 1995). O efeito inibidor da IL-10 na diferenciação de células T (Th1 em particular) parece dever-se aos seus efeitos sobre a secreção de IL-12 e à sua capacidade de inibição da expressão ou função do antígeno co-estimulador B7, na superfície de células apresentadoras de antígeno (Moore et al, 1993).

Está descrito que a infecção de ratinhos susceptíveis com *M. avium* 101 (virulenta) induziu a secreção de IL-10 (Bermudez e Champisi, 1993). O tratamento com IL-10 de macrófagos peritoneais infectados *in vitro* com *M. avium* suprimiu a bacteriostase induzida pelo TNF- $\alpha$  e pelo GM-CSF, e a administração de anticorpo monoclonal anti-IL-10 em ratinhos infectados conferiu maior resistência à infecção, o que sugere que a IL-10 possa ter um papel na patogénese da infecção por *M. avium* (Bermudez e Champisi, 1993). Denis também observou um aumento da bacteriostase após adição de anti-IL-10 quer a macrófagos peritoneais infectados *in vitro*, quer a ratinhos susceptíveis infectados *in vivo*, além de aumentada síntese de IL-10 em ratinhos infectados (Denis e Ghadirian, 1993). Por outro lado, Appelberg refere que IL-10 em dose alta induziu alguma bacteriostase na infecção *in vitro* de BMM $\emptyset$  com *M. avium* 25291, embora tenha inibido a bacteriostase induzida pelo IFN- $\gamma$  (Appelberg, 1995).

A interleucina-12 (IL-12), é produzida por macrófagos e linfócitos B em resposta à infecção por uma variedade de bactérias e parasitas (Stevens, 1995). A sua função principal parece ser a de regular as funções das células NK e dos linfócitos T, e o seu papel é fundamental na construção de uma resposta imune protectora do hospedeiro contra

microrganismos patogénicos intracelulares e infecções parasitárias, como por exemplo, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii*. A IL-12 promove o desenvolvimento das células Th1, *in vitro* e *in vivo* (Stevens, 1995).

Na infecção por *M. avium* a IL-12 parece desempenhar um papel importante. De facto, o sobrenadante de cultura de células NK tratadas com IL-12 apresentou um efeito bacteriostático no crescimento de *M. avium* 101 em macrófagos derivados de monócitos humanos (Bermudez et al, 1995). Este efeito da IL-12 demonstrou ser dependente da produção, pelas células NK, de TNF- $\alpha$  e GM-CSF, mas não de IFN- $\gamma$ , tendo sido inibido pela adição prévia de TGF- $\beta$  ou IL-10 às culturas de células NK (Bermudez et al, 1995). A depleção de IL-12 endógena através da administração de anticorpo monoclonal anti-IL-12 em ratinhos infectados por via intra-nasal com uma estirpe virulenta de *M. avium*, causou um aumento considerável no número de bactérias no pulmão, baço e fígado, 10 semanas após a infecção (Saunders et al, 1995). A administração deste anticorpo também inibiu a síntese de IFN- $\gamma$  por células esplénicas estimuladas por *M. avium*, e causou um decréscimo acentuado no número de células inflamatórias no pulmão, durante a infecção (Saunders et al, 1995). Castro et al demonstraram que a neutralização de IL-12 na infecção de ratinhos susceptíveis por *M. avium* 2447 (de virulência intermédia) bloqueou a indução de células T protectoras durante a infecção, indicando o envolvimento da IL-12 na indução destas células (Castro et al, 1995b). Aquela citocina também conferiu alguma protecção durante a infecção de ratinhos SCID (com imunodeficiência severa combinada) por *M. avium* 2447, o que sugere que a IL-12 está também envolvida na imunidade inata, uma vez que os ratinhos SCID não possuem células T (Castro et al, 1995b). As células NK serão, provavelmente, o alvo da activação pela IL-12.

Os factores estimuladores de colónias (CSFs) estimulam a expansão e diferenciação de células progenitoras da medula óssea. Algumas destas moléculas provocam a proliferação

das células progenitoras nas linhas celulares eritróide, mielóide, monocítica e megacariocítica. Os principais componentes deste grupo incluem: a IL-3, também denominada multi-CSF, que actua nas células precursoras mais imaturas; o G-CSF, que regula a produção de neutrófilos na medula óssea; o M-CSF, ou CSF-1, que estimula as células da linha monocítica-macrofágica; e o GM-CSF, o qual estimula a produção tanto de monócitos como de granulócitos da medula óssea (Stevens, 1995; Hogan e Vogel, 1988). O GM-CSF pode ser produzido por macrófagos e desempenha um papel importante na actividade destas células, nomeadamente na indução da actividade microbiostática/microbicida de macrófagos para parasitas intracelulares (Hogan e Vogel, 1988).

Na infecção por *M. avium*, o GM-CSF desempenha um importante papel na indução de actividade anti-micobacteriana, quer em macrófagos do sangue periférico humano (Bermudez e Young, 1990), quer em BMMØ murinos (Appelberg e Orme, 1993). Esta actividade pode ser potenciada pela adição de TNF- $\alpha$  (Bermudez e Young, 1990; Denis, 1991b), mas inibida pela adição de IFN- $\gamma$  (Bermudez e Young, 1990). Porém, em outro trabalho, Denis descreve que a infusão de vários CSFs durante a infecção por *M. avium* 702, conduz a um efeito bacteriostático nos ratinhos resistentes, exacerbando a infecção nos ratinhos susceptíveis. Na infecção *in vitro* de macrófagos residentes peritoneais de ratinhos resistentes e susceptíveis, apenas o GM-CSF causou um ligeiro efeito bacteriostático em ambas as populações de células, tendo os outros CSFs causado um aumento da proliferação bacteriana (Denis, 1991e). Porém, a neutralização de GM-CSF durante a infecção murina com *M. avium* 2447, não exerceu qualquer efeito na proliferação bacteriana no fígado e baço dos animais (Appelberg et al, 1994). Uma vez que a indução de bacteriostase pelo GM-CSF depende da estirpe de *M. avium* utilizada (Appelberg e Orme, 1993), a aparente contradição dos resultados pode não só depender da origem e população de macrófagos estudada, como também da estirpe de *M. avium*.

Está descrito que as vitaminas D3 e A conferem actividade micobacteriostática a células da linha celular J-774 contra *M. tuberculosis* H37Rv e *M. avium* ATCC 15769 e que a bacteriostase provocada pela adição de IFN- $\gamma$  é potenciada quando este mediador é adicionado conjuntamente com as vitaminas referidas (Rastogi, 1990). O efeito bacteriostático resultante da adição das vitaminas D3 e A foi também verificado em monócitos humanos infectados com *M. tuberculosis* da estirpe Erdman, por Crowle (Crowle et al, 1987; Crowle, 1990), e infectados com *M. tuberculosis* da estirpe H37Rv, por Rook et al (Rook et al, 1986b; Rook et al, 1987). A vitamina D3 está também envolvida na actividade anti-micobacteriana contra *M. avium* : de facto, a adição de vitamina D3 a macrófagos humanos infectados com *M. avium* 101 induziu actividade antibacteriana, e potenciou a produção de TNF- $\alpha$  e GM-CSF pelos macrófagos. A adição de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-GM-CSF às culturas tratadas com vitamina D3, sugeriu o envolvimento destas citocinas na acção da vitamina sobre os macrófagos (Bermudez et al, 1990b).

### **3.6. Participação de granulócitos neutrófilos, células NK e linfócitos, na resposta do hospedeiro à infecção por *M. avium***

A maior parcela do trabalho que constitui a base experimental para esta dissertação contemplou a interacção micobactéria/macrófago; daí que a maior ênfase desta dissertação seja dada a esse fagócito. No entanto, também outras células desempenham um papel fundamental na infecção do hospedeiro por *M. avium*, e devam ser aqui convenientemente referidas. Porém, citarei apenas alguns aspectos fundamentais do envolvimento de outras células, para além do macrófago, na infecção por esta micobactéria.



### 3.6.1. O neutrófilo

O granulócito neutrófilo é uma fagócito que tem sido muitas vezes considerado apenas uma célula efectora, participante na resposta inflamatória e na morte de vários microrganismos. Pensou-se, inclusivamente, que esta célula seria incapaz de síntese proteica, devido ao seu baixo número de ribossomas e à escassez de retículo endoplasmático. Porém, o neutrófilo é capaz de sintetizar proteínas envolvidas na sua função efectora, como actina, CR1, CR3, FcR (receptor Fc) e activador de plasminogénio (Lloyd e Oppenheim, 1992). Para além destas proteínas, o neutrófilo também produz citocinas como IL-1b, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-8 e IL-12, embora em baixa quantidade, o que o torna potencialmente capaz de influenciar a resposta imune celular e humoral (Lloyd e Oppenheim, 1992). Uma vez que no local da inflamação o número de neutrófilos pode ser elevado, a importância fisiológica da produção destas citocinas pelos neutrófilos não é de desprezar.

Os neutrófilos desempenham um papel importante nas infecções bacterianas, ocorrendo ao local da infecção primeiro que os monócitos e fagocitando as bactérias que tenham escapado aos macrófagos residentes. A sua actividade e quimiotaxia pode ser modulada por citocinas produzidas quer pelos próprios neutrófilos, quer por outras células, envolvidas na resposta imune celular (Ferrante et al, 1993; Perussia et al, 1987). Porém, uma vez que os neutrófilos são células de vida curta, o estudo do seu papel na infecção por micobactérias tem sido, de certa forma, menosprezado devido à possibilidade de as micobactérias patogénicas lhes sobreviverem. No entanto, é reconhecido que os neutrófilos estão envolvidos na infecção por micobactérias (Silva et al, 1989), quer colaborando com o macrófago, quer independentemente, sendo capazes de eliminar *M. tuberculosis* virulento ou

avirulento quando infectados *in vitro* (Brown et al, 1987; Jones et al, 1990). Após activação por IFN- $\gamma$  ou IL-8, são também capazes de exercer actividade bactericida contra *M. fortuitum* (Geertsma et al, 1990; Nibbering et al, 1993). Na infecção peritoneal crónica por várias micobactérias incluindo *M. bovis* BCG e *M. avium* em ratinhos, ocorre uma neutrofilia peritoneal persistente, que se mantém durante os três meses estudados da infecção (Silva et al, 1989, e que é dependente da presença de células T CD4+ e CD8+ (Appelberg e Silva, 1989; Appelberg, 1992a), e é mediada directamente pela produção das linfocinas Proteína Inflamatória do Macrófago-1 (MIP-1), e MIP-2 (Appelberg, 1992b), podendo também estar envolvidas outras citocinas, como IFN- $\gamma$  (Appelberg, 1992c). A actividade dos neutrófilos parece ser importante na resistência à infecção por *M. avium*, uma vez que a maior proliferação bacilar encontrada em ratinhos *beige* está relacionada com uma deficiência naquela actividade (Appelberg et al, 1995). De facto, a actividade antimicobacteriana de macrófagos peritoneais de ratinho contra *M. avium* ou *M. microti* aumentou após ingestão, pelos macrófagos, de material granulocítico, podendo ser bastante importante a colaboração entre o neutrófilo e o macrófago no local da infecção (Silva et al, 1989).

### 3.6.2. A célula "Natural Killer" (NK)

As células NK são uma subpopulação de linfócitos derivados da medula óssea, geralmente possuindo grânulos relativamente volumosos, tendo sido inicialmente caracterizadas pela capacidade de lise de células tumorais, independentemente do MHC (Bancroft, 1993). Estas células não possuem receptor da célula T (TCR),  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , nem expressam imunoglobulinas (Igs) à sua superfície. São capazes de secreção de várias citocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1b, GM-CSF, e TGF- $\beta$ , e lisam células do hospedeiro infectadas com agentes patogénicos intracelulares, desempenhando assim um importante

papel na defesa do hospedeiro contra as infecções (Bancroft, 1993). Estas células encontram-se largamente distribuídas no organismo, tendo sido identificadas no sangue, baço, nódulos linfáticos, timo, pulmão, fígado e intestino (Greenberg, 1989).

Para a compreensão da actividade anti-bacteriana das células NK contribuiu largamente o estudo realizado na infecção de ratinhos possuindo a mutação SCID, os quais não possuem células que expressem receptores TCR e Igs, mas possuem células NK com actividade normal. Foi demonstrado que ratinhos SCID infectados com a bactéria *Listeria monocytogenes*, conseguem efectuar um certo controlo da infecção, e que os seus macrófagos se encontram activados (Bancroft et al, 1986). Essa activação é conseguida através da secreção de IFN- $\gamma$  por células NK, após serem estimuladas por TNF- $\alpha$  (Bancroft et al, 1987; Bancroft et al, 1989). A produção desta citocina será induzida nos macrófagos infectados pelas bactérias e será necessária a presença de um componente bacteriano ou de uma outra citocina co-estimulante para que a síntese de IFN- $\gamma$  ocorra a níveis óptimos (Wherry et al, 1991). A IL-12 parece ser um forte candidato, uma vez que apresenta um sinergismo com TNF- $\alpha$  para a indução de IFN- $\gamma$  na ausência de microrganismos (Tripp et al, 1993).

Na infecção por *M. avium*, as células NK desempenham um importante papel. Com efeito, está descrito que a administração de anticorpo anti-NK em ratinhos infectados com esta micobactéria, causa um significativo aumento do crescimento bacteriano após quatro semanas (Harshan e Gangadharam, 1991). Células NK murinas activadas *in vitro* com IL-2 ou *in vivo* durante a infecção com *M. avium* 101, são capazes de activar macrófagos de ratinho para a eliminação dos bacilos após infecção *in vitro* com *M. avium* (Bermudez et al, 1990a). Está também descrito que monócitos humanos incubados com sobrenadante de cultura de células NK activadas por IL-2 apresentam actividade micobactericida contra *M. avium* 101, sendo esta actividade parcialmente dependente da presença de TNF- $\alpha$  nesses sobrenadantes (Bermudez e Young, 1991).

### 3.6.3. O linfócito B

Os linfócitos B são células especializadas no fabrico de anticorpos, ou seja, as imunoglobulinas. Estas moléculas podem ser secretadas, ou também ser expressas à superfície da célula, constituindo o receptor para o antígeno das células B. Quando uma célula B é estimulada por ligação de um determinado antígeno ao seu receptor Ig, o qual é específico para um certo epítoto antigénico, essa célula vai proliferar, dando origem a um clone de células B activadas, os plasmócitos, com a mesma especificidade da célula precursora. Esta proliferação e activação é controlada pela acção de linfocinas, como IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , produzidas pelas células T (Kincaid e Gimble, 1993).

A resposta humoral é importante na resistência do hospedeiro a variadas infecções causadas por parasitas extracelulares, não tendo sido dada importância a este tipo de resposta no caso de infecções por parasitas intracelulares obrigatórios. Porém, a produção excessiva de anticorpos pode levar a uma resposta imune celular diminuída e aumentar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção (D'Império-Lima et al, 1985; Arala-Chaves et al, 1986; Ferreira et al, 1991). Em indivíduos com lepra lepromatosa, foram encontrados níveis altos de anticorpos IgG e IgM específicos para o antígeno micobacteriano PGL-1, anticorpos esses raramente detectados em doentes com lepra tuberculóide (David, 1990). Embora na tuberculose a relação entre os níveis de anticorpos específicos e a evolução da doença não seja tão clara, David postula que poderá haver um equilíbrio fundamental entre a resposta imune celular e humoral, de tal forma que a resposta humoral atinja o seu máximo na ausência de imunidade celular, decresça à medida que esta é estabelecida e desapareça quando a imunidade celular atinge, por sua vez, o seu máximo (David, 1990). Também na infecção

por *M. avium* em ratinhos foi encontrada uma correlação entre o elevado nível de anticorpos específicos e não-específicos na estirpe hospedeira e a susceptibilidade desta à infecção (Ferreira et al, 1991). Em trabalho mais recente, foi avaliado o progresso da infecção murina por *M. avium* em duas estirpes congénicas para o gene *Bcg* (Xu et al, 1995). Verificou-se que na fase tardia da infecção, o número de células T CD4+ decresceu dramaticamente e os níveis séricos de IgG e IgM aumentaram consideravelmente na estirpe *Bcg*<sup>s</sup> (a qual permitiu uma proliferação acentuada dos bacilos) comparativamente à estirpe *Bcg*<sup>r</sup> (na qual o crescimento bacilar foi controlado) (Xu et al, 1995). Estes resultados sugerem um possível envolvimento da activação policlonal B no estabelecimento de imunossupressão, a qual poderá contribuir para uma proliferação micobacteriana acentuada.

#### 3.6.4. O linfócito T

Enquanto que as células B são as responsáveis pela resposta imune humoral, as células T controlam a imunidade celular, como certos tipos de lise celular, hipersensibilidade retardada e reacções decorrentes da transplantação, desempenhando também um papel fundamental na resposta humoral a antígenos T-dependentes. O controlo das duas últimas funções referidas é efectuado via produção de mediadores, ou seja, as linfocinas. Na sua maioria, as células T expressam um receptor específico para o antígeno composto de cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$ , embora uma minoria expresse um tipo diferente de receptor, composto de cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ . As células T  $\alpha\beta$  reconhecem o antígeno só após apresentação no contexto do MHC, por uma célula apresentadora de antígeno (APC). O reconhecimento do antígeno induz os linfócitos T a proliferarem e diferenciarem-se em células activadas, expressando variadas funções efectoras. Por sua vez, as células T  $\alpha\beta$  podem ser subdivididas em CD4+ ou CD8+, conforme expressem um ou outro antígeno à sua superfície. As células CD8+,

estimuladas no contexto do MHC classe I, tornam-se citotóxicas após activação destruindo, por contacto, células alvo que expressem o antigénio para o qual são específicas. As células CD4+, estimuladas no contexto do MHC classe II, por outro lado, geralmente expressam sinais positivos, como "ajuda" à diferenciação das células B, ou activação do macrófago, embora em certas situações, possam também ter actividade citotóxica. Os linfócitos T  $\gamma\delta$  típicos são CD4- e CD8-, embora uma pequena proporção seja CD8+. As células  $\gamma\delta$  são relativamente raras em humanos e em ratinhos, sendo, porém abundantes em aves, ovelhas e gado. Em todas as espécies estudadas, estas células existem em menor número nos tecidos linfóides, mas em grande número nos tecidos epiteliais, como a pele, intestino e aparelho genitourinário. É provável que o reconhecimento do antigénio pela maioria das células T  $\gamma\delta$  não se processe da mesma forma que o das células  $\alpha\beta$ , ou seja, no contexto do MHC da APC; no entanto, este assunto carece de estudos mais aprofundados (Sprent, 1993).

As células T CD4+, também denominadas T "helper", dividem-se, no ratinho, em dois subtipos distintos correspondendo, a cada um deles, a síntese de um determinado perfil de linfocinas: as células Th1, sintetizam IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas não IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 as quais são sintetizadas pelas células Th2 (Heinzel, 1995). Existe também evidência de se encontrarem ambos os subtipos em humanos (Romagnani, 1991). Ambos os tipos parecem derivar de uma população precursora (Th0), a qual terá o potencial de produzir toda a gama de linfocinas. A diferenciação das células Th0 em Th1 ou Th2 pode ser influenciada por diferentes factores, como o tipo de antigénio utilizado para a imunização, a via de imunização, o tipo de célula apresentadora de antigénio, e as características genéticas do animal. A orientação para a diferenciação se desenrolar num ou noutro sentido é, no entanto, controlada por citocinas. Para que as células Th0 se diferenciem em Th2, parece ser necessário o contacto com IL-4, enquanto que a diferenciação no sentido Th1 parece necessitar do contacto com IFN- $\gamma$  (Sprent, 1993) e IL-12 (Hsieh et al, 1993).

Devido ao diferente perfil de citocinas secretadas, as funções das células Th1 e Th2 são distintas. Assim, a secreção de IFN- $\gamma$  torna as células Th1 principalmente responsáveis pelas reacções de hipersensibilidade retardada, e pela activação do macrófago no sentido de destruir patogénios intra e extracelulares. Por outro lado, as funções das células Th2 são uma consequência da síntese de IL-4 e IL-5, as quais são factores de crescimento e diferenciação de linfócitos B. Por esse motivo, as células Th2 estimulam a colaboração célula T/célula B, podendo também causar eosinofilia (por exemplo, nas infecções por parasitas), devido à secreção de IL-5 (Sprent, 1993).

Algumas linfocinas produzidas pelos subtipos Th1 e Th2 são inibitórias para o subtipo oposto. Assim, a IL-4 e a IL-10 produzidas pelas células Th2 vão suprimir a função das células Th1, enquanto que o IFN- $\gamma$  libertado pelas células Th1 é inibitório para as células Th2 (Sprent, 1993).

As células T  $\gamma\delta$  parecem estar envolvidas na resposta do hospedeiro a patogénios, como *Listeria monocytogenes* (Mombaerts et al, 1993) e outras infecções, incluindo bactérias, vírus e parasitas (Kronenberg, 1994). Existem também evidências de que as células T  $\gamma\delta$  participam na resposta imune a micobactérias, tanto em humanos como em outros modelos animais. Com efeito, existem na literatura dados referentes a esta participação na infecção murina por *M. bovis* BCG (Izzo e North, 1992), e na infecção murina e humana por *M. tuberculosis* (Griffin et al, 1991; Orme et al, 1993). As células T  $\gamma\delta$ , após estimulação com micobactérias, produzem várias linfocinas e podem expressar actividade citolítica tendo, assim, uma função semelhante às células T  $\alpha\beta$ . Uma vez que as células T  $\gamma\delta$  são activadas primeiro que as células T  $\alpha\beta$ , elas poderão participar na activação macrofágica precoce, anterior ao estabelecimento da resposta T  $\alpha\beta$  (Kaufmann, 1993).

Os linfócitos T CD8+ também parecem desempenhar um papel importante nas infecções por micobactérias, uma vez que ratinhos incapazes de produzir células T CD8+ dado possuírem um MHC classe I defeituoso, quando recebem uma dose sub-letal de

*M.tuberculosis*, para ratinhos normais, morrem após doença progressiva (Flynn et al, 1992). Hubbard et al, estudando a infecção murina por *M. avium* TMC 724, uma estirpe virulenta, verificaram que a depleção de células CD4+ ou CD8+ isoladamente não alterou a resistência transmitida a ratinhos recipientes após transferência adoptiva (Hubbard et al, 1992); porém, a depleção de ambos os tipos celulares eliminou completamente a transferência de resistência, o que sugeriu a importância conjunta das células CD4+ e CD8+ nesta infecção (Hubbard et al, 1992). Para além de produzirem IFN- $\gamma$ , embora em doses baixas, as células CD8+ podem desempenhar o seu papel lisando os macrófagos infectados e permitindo a subsequente destruição das bactérias por monócitos recém-chegados, ou lisando células fagocíticas "não-profissionais" (como fibroblastos, as quais podem internalizar micobactérias em certas condições), libertando assim as micobactérias para os fagócitos profissionais (Orme, 1993). No entanto, resultados obtidos por Appelberg et al não sugerem uma participação das células CD8+ no controlo da infecção murina por *M. avium* 2447, de virulência intermédia, uma vez que no trabalho realizado por estes autores apenas a neutralização de células CD4+ durante a infecção permitiu maior proliferação bacteriana, não se observando o mesmo após neutralização de células CD8+ (Appelberg et al, 1994). Na lepra lepromatosa a população T CD8+ predomina sobre a população CD4+, enquanto que esta predomina na lepra tuberculóide, o que poderá fazer crer que uma maior população CD8+ está associada a uma maior susceptibilidade à infecção (Modlin e Nutman, 1993).

A grande maioria do trabalho sobre o papel das células T na infecção por micobactérias tem sido orientado para o estudo das células CD4+, devido ao seu perfil de produção de linfocinas controlando toda a imunidade celular. A resposta celular do tipo Th1 parece ser a associada com maior resistência na lepra, uma vez que doentes que expressam níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  apresentam lesões tuberculóides, enquanto que doentes que expressem níveis elevados de IL-4, IL-5, e IL-10 apresentam lesões lepromatosas (Orme, 1993; Modlin e Nutman, 1993). Dados contraditórios aparecem, porém, na literatura, uma vez que Mutis et al referem que a infecção por *M. leprae* em



humanos induz preferencialmente a formação de células Th1 em todo o espectro da doença; referem também que, embora algumas células T de doentes com lepra lepromatosa secretem, além de IFN- $\gamma$ , IL-4 e/ou IL-10, estas citocinas não estão associadas à falta de resposta das células T específicas observada na lepra lepromatosa (Mutis et al, 1993). No entanto, em trabalho mais recente, Sieling et al demonstraram que os doentes com lepra lepromatosa apresentam uma síntese deficiente de IL-12, devido a secretarem níveis elevados de IL-4 e IL-10, as quais têm uma acção inibitória no macrófago; estas linfocinas não são, porém, secretadas por células CD4+ Th2, mas sim por células CD8+ com características secretórias de Th2. Sendo administrada a esses doentes IL-12 recombinante, é estabelecida uma resposta do tipo Th1, e a doença evolui para a forma tuberculóide (Sieling et al, 1994). Na tuberculose, a associação da gravidade da doença com uma resposta Th1 ou Th2 não é tão nítida, uma vez que embora muitos clones específicos para o *M. tuberculosis* sejam classificados como Th1, outros estudos indicam um perfil de produção de citocinas mais heterogéneo, talvez do tipo Th0 (Modlin e Nutman, 1993; Boom et al, 1991).

Na infecção por *M. avium*, também os dados existentes não são muito claros. Stokes e Collins verificaram que em ratinhos susceptíveis infectados com uma estirpe virulenta de *M. avium* (estirpe TMC 702) ocorreu indução de células T protectoras, as quais conferiram resistência em ratinhos recipientes após transferência adoptiva. Nos ratinhos resistentes onde esta estirpe de *M. avium* não proliferou, não houve indução de imunidade protectora (Stokes e Collins, 1990). Denis, trabalhando com a mesma estirpe de *M. avium* mas uma estirpe diferente de ratinhos susceptíveis, isolou 10 clones T a partir do baço à quarta semana de infecção: seis clones CD4+ Th1, dois clones CD4+ Th2 e dois clones CD8+. De todos estes, apenas um clone Th2 foi capaz de transferir protecção para ratinhos recipientes, não sendo possível identificar que características celulares foram as responsáveis por esta protecção (Denis, 1992). Porém, Castro et al, mostraram que em ratinhos infectados com uma estirpe de *M. avium* de baixa virulência (estirpe 2447) era induzida uma resposta do tipo Th1, enquanto que em ratinhos infectados com uma estirpe de alta virulência (estirpe 25291) essa

resposta não ocorria, não sendo, porém clara a indução de uma resposta Th2 nestes ratinhos (Castro et al, 1995a). Assim, poderá haver também para a infecção por *M. avium* uma associação entre a indução de uma resposta Th1 e uma resistência aumentada à infecção. Porém, todos estes dados necessitam de confirmação.

\*\*\*

Na infecção de um hospedeiro por micobactérias estão envolvidos numerosos tipos celulares e uma grande diversidade de mecanismos. A interação de todos estes factores decidirá qual o destino dessa infecção e quem vencerá a "guerra" estabelecida: a micobactéria ou o hospedeiro. É, pois, de importância fundamental o conhecimento cada vez mais detalhado e preciso de todos os aspectos envolvidos no controlo ou exarcebamento da infecção, uma vez que a aplicação desse conhecimento poderá permitir ao hospedeiro da espécie humana assegurar a sua sobrevivência quando infectado com o agente patogénico micobacteriano.

**OBJECTIVOS:**

O objectivo do trabalho incluído na presente dissertação consistiu, fundamentalmente, em identificar alguns mecanismos da imunidade inata do ratinho à infecção por *M. avium*, nomeadamente:

1. Papel do gene *Bcg* na infecção por *M. avium* no ratinho e da função macrofágica *Bcg*-dependente associada a resistência/susceptibilidade.
2. Envolvimento do TNF- $\alpha$  na virulência dos morfotipos SmTr e SmOp de *M. avium* 2.151.
3. Envolvimento do TNF- $\alpha$  na virulência das estirpes 25291 e 1983, e na diferença de crescimento bacilar encontrado em ratinhos *Bcg*<sup>S</sup> e *Bcg*<sup>r</sup>.
4. Identificação do mecanismo responsável pela bacteriostase TNF- $\alpha$ -dependente observada *in vitro* para a estirpe 1983. Estudo de possíveis bases da virulência da estirpe 25291.

## TRABALHO EXPERIMENTAL

1. 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. 80:324-331
2. Appelberg,R., Sarmiento,A., Castro,A.G. 1995. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence. Clin.Exp.Immunol. 101:308-313
3. Sarmiento,A.M., Appelberg,R. 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in *in vitro*-cultured mouse macophages. Infect.Immun. 63:3759-3764
4. Sarmiento,A., Appelberg,R. 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in the tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. Infect.Immun. in press.

## **Artigo nº 1**

## The role of macrophage activation and of *Bcg*-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice

R. APPELBERG & A. M. SARMENTO, *Centro de Citologia Experimental, University of Porto, Porto, Portugal*

(Accepted for publication 18 January 1990)

### SUMMARY

Following the intraperitoneal inoculation of  $2.5 \times 10^8$  colony-forming units of *Mycobacterium avium* strain ATCC 25291, there was bacillary growth in the liver, spleen and peritoneal cavity of C57BL/6, C57BL/10, DBA/1 and BALB/c mice whereas DBA/2, C3H/He, CBA/Ca and CD-1 mice controlled the infection showing constant or slightly decreasing numbers of viable bacteria in the liver and spleen and effective clearance of the bacilli from the peritoneal cavities. The acquisition of non-specific resistance (NSR) to *Listeria monocytogenes* during the infection by *M. avium* was high in C57BL/6, BALB/c and C3H/He mice and negligible in DBA/2 and CD-1 mice. The magnitude of the acquisition of NSR was reduced in T cell-deficient mice and was directly proportional to the dose of the inoculum of *M. avium*. The production of hydrogen peroxide by phorbol myristate acetate-stimulated peritoneal macrophages of *M. avium*-infected mice was higher in C57BL/6 and BALB/c mice than in CD-1, DBA/2 and C3H/He animals. BALB/c, *Bcg*<sup>r</sup> (C.D2) mice, unlike their congenic strain BALB/c, restricted bacterial growth following the intravenous inoculation of  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* as efficiently as DBA/2 mice. C.D2 and BALB/c peritoneal macrophages from infected mice produced similar amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but BALB/c mice developed higher levels of NSR to listeria than C.D2 mice. The production of nitrite by peritoneal macrophages from infected mice was found to be enhanced in DBA/2 and C3H/He but not in BALB/c, C57BL/6, CD-1 and C.D2 mice. Resident peritoneal macrophages from C.D2 mice were more bacteriostatic *in vitro* for *M. avium* than macrophages from BALB/c mice. The same relative differences between the two macrophage populations were observed when the cells were activated with lymphokines. The results show that the resistance to *M. avium* infection in mice is under the control of the *Bcg* gene and that susceptibility may be due to some defect in macrophage antibacterial function not completely overcome by the activation of this phagocyte in the susceptible strains of mice.

**Keywords** mycobacteria macrophage activation *Bcg* gene immune response

### INTRODUCTION

In recent years, the importance of *Mycobacterium avium* has been increasing due to the high incidence of infections by this pathogen in immunocompromised patients, namely those with AIDS (Grange & Yates, 1986). It was found that *M. avium*-infected individuals are anergic to the homologous antigens and that their mononuclear cells do not produce interleukin-2 after antigenic stimulation (Tsuyuguchi *et al.*, 1988). In the mouse, non-specific immunosuppression has been described in heavily infected animals (Watson & Collins, 1980, 1981). On the other hand, it has also been shown that, despite the occurrence of unresponsiveness, a strong immune response to the infection may occur (Appelberg *et al.*, 1989; Orme, 1988; Orme & Collins, 1984).

Different strains of mice vary in their relative susceptibilities to *M. avium* (Orme, Stokes & Collins, 1986; Stokes, Orme &

Collins 1986) and to *M. intracellulare*, a closely related species (Goto *et al.*, 1984). A polygenic control of resistance to *M. avium* has been shown by Orme *et al.* (1986). However, with *M. intracellulare*, the resistance to infection has been shown to be associated with the *Bcg* gene. We decided to address this problem further using a *M. avium* strain that had shown a distinct growth behaviour in resistant and susceptible strains of mice (Appelberg *et al.*, 1989). Furthermore, we looked at the acquisition of macrophage activation during the infection in resistant and susceptible strains of mice, since this problem has not been thoroughly studied (Orme *et al.*, 1986). In fact, in that study, only two mouse strains were studied, looking at one parameter of macrophage activation, and the emphasis was given to the study of the survival of *M. avium* in activated macrophages (Orme & Collins, 1983; Stokes *et al.*, 1986; Stokes & Collins 1988). Finally, we assessed the participation of T cells in the activation of the mononuclear phagocytes and its relation to the mycobacterial load. We show here that resistance to infection is related to the expression of the *Bcg* gene and that the

Correspondence: R. Appelberg, Centro de Citologia Experimental, R. Campo Alegre, 823, 4100 Porto, Portugal

susceptibility of the Bcg<sup>+</sup> mice was not associated with a deficient macrophage activation. On the contrary, although macrophage activation did not strictly correlate with resistance/susceptibility to *M. avium*, it tended to be higher in the susceptible mouse strains. Both T dependent and T independent mechanisms of macrophage activation seemed to occur.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

CD-1 and C57BL/6 mice were purchased from Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras, Portugal); BALB/c, C3H/He, DBA/2<sup>j</sup>, CBA/Ca and C57BL/10 were from Bantin and Kingman (Hull, UK) and DBA/1 from Harlan Olac (Bicester, UK). BALB/c. Bcg<sup>+</sup> (C.D2) mice were bred at our facilities from parent mice generously given by Dr E. Skamene. The animals were kept under standard hygiene conditions, fed commercial chow and given acidified drinking water *ad libitum*. They were used within 6–8 weeks of age. Athymic nude mice (C57BL/6 nu/nu) and euthymic C57BL/6 nu/+ mice were purchased from Bommia (Ry, Denmark) and kept in sterilized housing and given sterile food and water. T cell depleted mice were obtained from adult BALB/c mice which were thymectomized at 8 weeks of age, irradiated (750 rad of X-radiation) and given  $2 \times 10^6$  bone marrow cells that were pre-treated *in vitro* with anti Thy 1.2 monoclonal antibody (1/100 dilution of culture supernatant from hybridoma HO-13-14) plus 1:10 dilution of guinea-pig serum.

### Bacteria

*M. avium* ATCC 25291 was grown in Middlebrook 7H9 medium (DIFCO, Detroit, MI) for two weeks. The bacteria were collected by centrifugation and were suspended in a small volume of saline with 0.04% Tween 80 (T80) (Sigma, St Louis, MO), briefly sonicated (15 sec, at 50 W) with a Branson sonifier to disrupt bacterial clumps and diluted in the same medium to an OD<sub>600</sub> of 0.48 being then frozen at -70°C. When needed, aliquots were thawed at 37°C, diluted to the desired concentration and inoculated. *Listeria monocytogenes* CCM 5576 was cultured in antibiotic 3 medium (DIFCO) for 36 h and aliquots were frozen at -70°C until use being then diluted in saline to the appropriate concentration before inoculation.

### Evaluation of bacillary growth

The number of CFU of *M. avium* in the spleen and liver of infected mice was determined by serial diluting and plating the tissue homogenates onto 7H10 agar medium (DIFCO). The CFU numbers in the peritoneal cavities were determined in the same way as with the tissue homogenates using an aliquot of the collected lavage fluid which was treated with 0.1% saponin (Sigma) to lyse the cells.

### Study of the non-specific resistance to *Listeria monocytogenes*

At different times of *M. avium* infection, mice were intravenously inoculated with  $1.5 \times 10^6$  CFU of *L. monocytogenes* and the index of immunity (II) was calculated at 48 h as described previously (Appelberg *et al.*, 1989). It is equal to the difference between the log<sub>10</sub> of the *Listeria* CFU in the control (*M. avium*-non-infected) mice and the log<sub>10</sub> of the CFU of *Listeria* in the *M. avium*-infected mice. Since we did not find any significant differences in the CFU numbers of *Listeria* in controls of the six

strains infected for 48 h with the same inoculum dose used to assess NSR (data not shown), we assume that no other loci in addition to the Bcg gene (e.g. the Hc locus) are affecting the acquisition of such parameters of macrophage activation. The results are expressed as a difference between two means. Therefore, no data are presented for a s.d. value. However, the s.d. of the geometric mean of the CFU for each group was smaller than 5% of the mean.

### Study of hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages

The peritoneal exudate of intraperitoneally infected mice was collected with Hanks' balanced salt solution (HBSS) (GIBCO, Grand Island, NY) and centrifuged over 55% Percoll (Sigma). The overlying ring of cells devoid of granulocytes was collected, extensively washed with cold HBSS and the cell suspension was counted;  $1 \times 10^6$  cells in RPMI 1640 medium (GIBCO) were added to each well of 24-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and incubated for 1.5–2 h at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed by washing with warm phenol red-free HBSS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was evaluated as described by Ruch, Copper & Baggiolini (1983). After the reaction, the supernatant was collected for fluorimetric analysis and the protein content of the cell monolayer was determined. Results are expressed as nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> µg of protein/60 min.

### Study of nitrite production by peritoneal cells

Peritoneal cells were collected as described above and plated ( $1 \times 10^6$  cells/well) in 24-well plates in 0.4 ml of RPMI 1640 medium. After removing the non-adherent cells, the monolayer was incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) (GIBCO) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> as above, either in the absence or presence of 10 ng of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS) (Sigma)/ml. The nitrite content of the supernatant was determined at 24 h of culture using the Griess reagent (Green *et al.*, 1982) as described by Stuehr & Marletta (1985).

### In vitro infection of macrophage monolayers

Resident peritoneal cells were collected with HBSS, washed, counted and plated in 24-well plates ( $3 \times 10^6$  cells per well). After removal of non-adherent cells, 200 µl of RPMI 1640 medium with  $5 \times 10^6$  CFU of *M. avium* were added per well and incubated for 4 h. The non-phagocytosed bacilli were removed by extensive washing of the wells with warm HBSS. A group of wells were then lysed with saponin 0.1% (Sigma) and serial dilutions were seeded onto Middlebrook 7H10 medium with OADC supplement for CFU counts ( $t = 0$ ). The other wells were added 400 µl of RPMI 1640 medium with 10% FCS and incubated for different periods of time. Cells were then lysed as described and CFU counts were made. To some wells, 100 µl of lymphokine-containing medium were added daily. This medium was obtained from supernatants of spleen cell cultures ( $50 \times 10^6$  cells in 20 ml RPMI medium with 10% FCS 10 cm diameter tissue culture dishes) stimulated for 48 h with 4 µg of concanavalin A/ml, after coinoculation with Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (1:1).

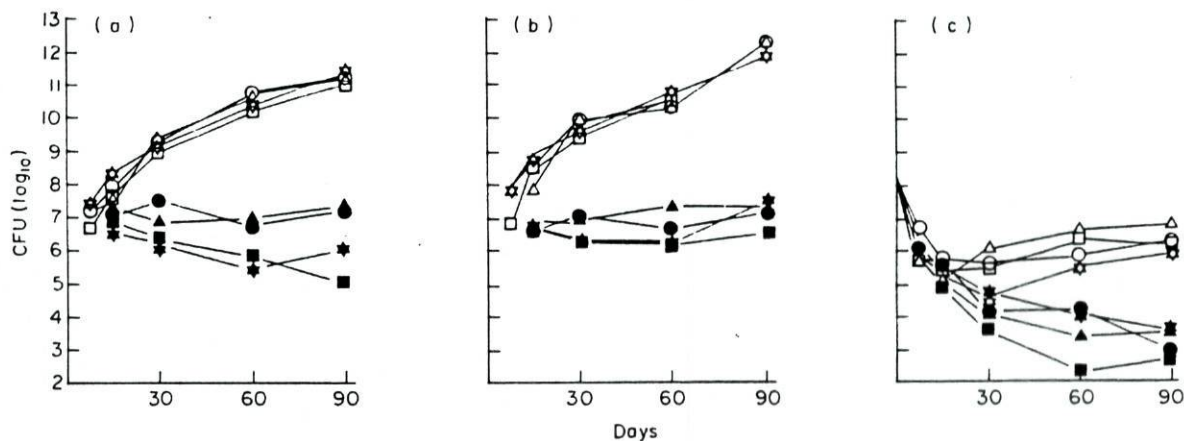


Fig. 1. Colony-forming units (CFU) numbers in the spleen (a), liver (b), and peritoneal cavity (c) of mice inoculated intraperitoneally with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium*. CFU counts were performed at different times of infection up to 90 days. Each value represents the mean of four to eight mice of the following strains: C57BL/6 (○), C57BL/10 (□), DBA/1 (△), BALB/c (▽), CD-1 (●), DBA/2 (▲), C3H/He (★) and CBA/Ca (■). The s.d. of the geometric mean of CFU was smaller than 5% of the mean for any time point and was not depicted for sake of clarity.

## RESULTS

A roughly constant number of CFU was detected in the spleen and liver of CD-1, C3H/He, DBA/2 and CBA/Ca mice inoculated IP with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* throughout the 3 months of the study (Fig. 1a, b). These resistant strains showed a progressive clearance of the inoculum in the peritoneal cavity along the time of the infection (Fig. 1c). They did not show any detectable signs of disease. On the contrary, C57BL/6, C57BL/10, DBA/1 and BALB/c mice showed progressive bacterial proliferation in the spleen and liver (Fig. 1a, b) while the initial clearance of the peritoneal inoculum was substituted after the first 15 to 30 days post-inoculation by a progressive bacillary multiplication plateauing at about  $10^6$  to  $10^7$  CFU per peritoneal cavity (Fig. 1c). These susceptible mice died from the infection in 3–4 months showing signs of cachexia (weight loss, muscle and subcutaneous tissue atrophy, ruffled fur) and massive hepatomegaly and splenomegaly with loss of the normal red colour of these organs which appeared pale and upon histologic examination exhibited extensive infiltration by heavily infected foamy macrophages (not shown).

The development of NSR to a heterologous bacterial challenge was studied. This parameter is an *in vivo* measure of systemic macrophage activation (North, 1974; North & Spitalny, 1981).

*M. avium*-resistant CD-1 and DBA/2 mice did not develop any significant levels of NSR to a *Listeria* challenge during 90 days of infection by  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* (Fig. 2). On the other hand, *M. avium*-susceptible C57BL/6 and BALB/c mice and *M. avium*-resistant C3H/He mice developed high levels of NSR peaking at 15 days of *M. avium* infection (Fig. 2). The development of NSR during *M. avium* infection was reduced in nu/nu as compared with nu/+ C57BL/6 mice (Fig. 3a). Similarly, T cell depletion of adult BALB/c mice led to a reduction in their ability to develop NSR during *M. avium* infection (Fig. 3b). The levels of NSR acquired at 15 days of *M. avium* infection varied with the mycobacterial inoculum dose and between the different mouse strains (Fig. 4). Thus, C57BL/6 and BALB/c mice showed enhanced levels of NSR for the lower inocula tested ( $6 \times 10^6$  and  $6 \times 10^7$  CFU) while NSR

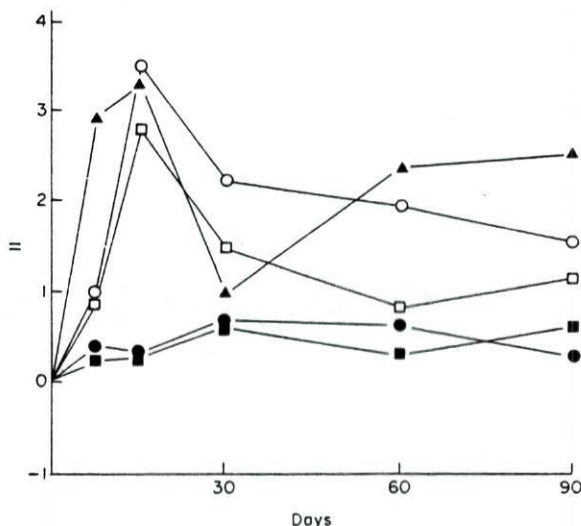


Fig. 2. Development of non-specific resistance to *Listeria monocytogenes* expressed as the Index of Immunity (II) in mice infected with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* up to 90 days of infection. Each point represents the mean of three or four mice of the following strains: CD-1 (■), DBA/2 (●), C3H/He (▲), C57BL/6 (□) and BALB/c (○).

was not detected for such inoculum doses in infected CD-1, C3H/He and DBA/2 mice (Fig. 4). With infections by  $6 \times 10^8$  CFU of *M. avium*, C3H/He already exhibited high levels of NSR, similar to those found in C57BL/6 and BALB/c mice. Only with the higher inocula ( $6 \times 10^9$  CFU) were the levels of NSR high in the CD-1 and DBA/2 mice.

Since immunologically activated macrophages produce enhanced levels of hydrogen peroxide (Adams & Hamilton, 1984), this parameter was also studied for comparison with the previous results. The amount of  $H_2O_2$  produced by peritoneal macrophages from *M. avium*-infected mice (15 and 30 days of intraperitoneal infection) was higher in the susceptible C57BL/6 and BALB/c strains than in the resistant CD-1, C3H/He and DBA/2 strains (Fig. 5).



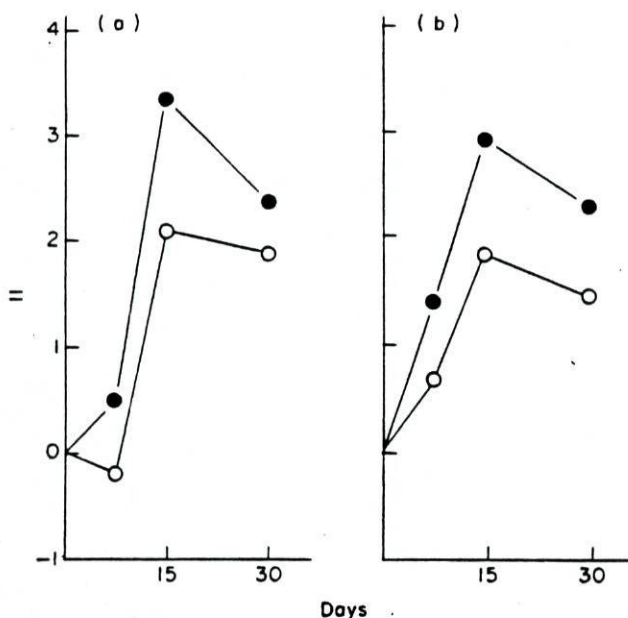


Fig. 3. Development of non-specific resistance to Listeria in C57BL/6 nu/nu (O) or nu/+ (●) mice (a) and in T-cell depleted (O) or control (●) BALB/c mice (b) intravenously infected for up to 30 days with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium*.

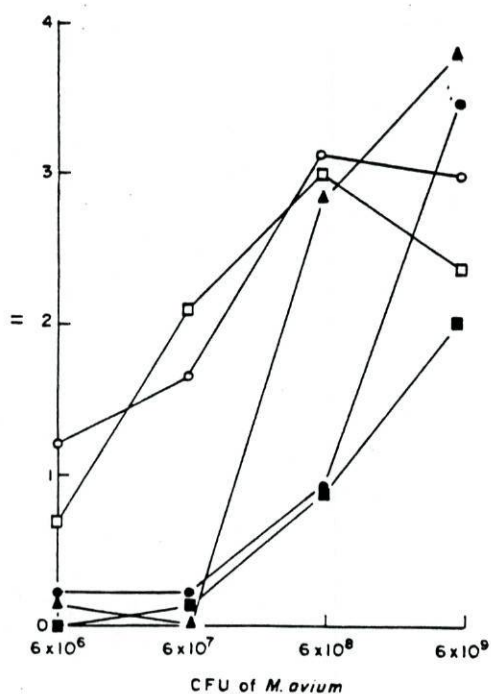


Fig. 4. Development of non-specific resistance to Listeria in C57BL/6 (□), BALB/c (○), CD-1 (●), DBA/2 (■) and C3H/He (▲) mice intravenously infected for 15 days with various inoculum doses of *M. avium*.

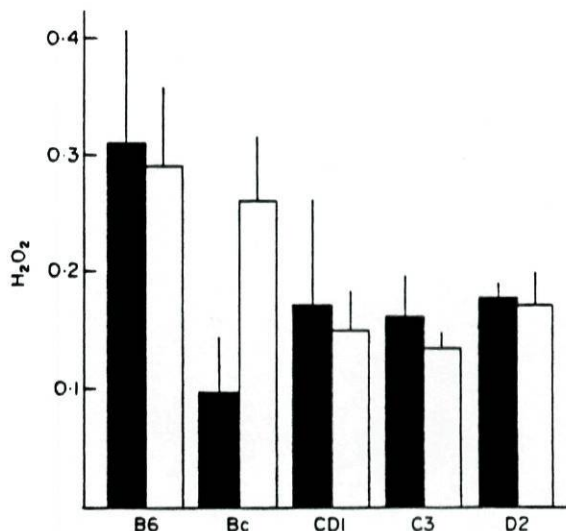


Fig. 5. Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peritoneal macrophages of C57BL/6 (B6), BALB/c (Bc), CD-1, C3H/He (C3) and DBA/2 (D2) mice intraperitoneally infected with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* for 15 (closed columns) or 30 (open columns) days. Each value represents the mean of four pools of two mice. Data are expressed as nmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/μg of adherent cell protein/60 min.

The study of the susceptibility to *M. avium* infection among the seven inbred strains of mice shown above suggested a role for the *Bcg* gene in the regulation of such susceptibility. This was further tested by studying the susceptibility of a BALB/c congenic strain that has received a segment of chromosome 1 from DBA/2 mice that contains the *Bcg*<sup>r</sup> allele. This mouse strain, BALB/c.*Bcg*<sup>r</sup> (C.D2), did not allow the proliferation of *M. avium* in their spleens and liver unlike the congenic BALB/c which exhibited extensive bacterial multiplication in those organs following the intravenous inoculation with  $2 \times 10^8$  CFU of *M. avium* (Fig. 6). In fact, C.D2 mice were as resistant as the donor strain DBA/2. The peritoneal macrophages from infected C.D2 and BALB/c mice produced similar amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 15 and 30 days of intraperitoneal infection (macrophages from C.D2 mice produced  $52.3 \pm 19.5$  and  $98.6 \pm 27.4$  nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein at days 15 and 30, respectively and macrophages from BALB/c mice produced  $38.2 \pm 22.1$  and  $126.8 \pm 20.1$  nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein at the same times of infection). The development of NSR was higher in BALB/c than in C.D2 mice (Fig. 7).

Immunological activation of macrophages has been shown to lead to enhanced secretion of reactive nitrogen intermediates including nitrite (Ding, Nathan & Stuehr, 1988; Stuehr & Marletta, 1985). Peritoneal macrophages from infected mice were cultured *in vitro* for 24 h and the nitrite content of the culture supernatants was evaluated. Only the cells from infected DBA/2 and C3H/He mice produced nitrite amounts that were significantly higher than those produced by resident peritoneal macrophages from uninfected mice (Fig. 8a). The presence of LPS in the culture medium led to a general increase in the amounts of nitrite produced including those secreted by resident peritoneal cells (from  $0.070 \pm 0.004$  to  $0.112 \pm 0.028$  nmol/μg of protein/60 min.). Again, DBA/2 and C3H/He cells produced enhanced levels of nitrite as compared with resident cells (Fig. 8b). C57BL/6 mice at 15 days of infection also showed

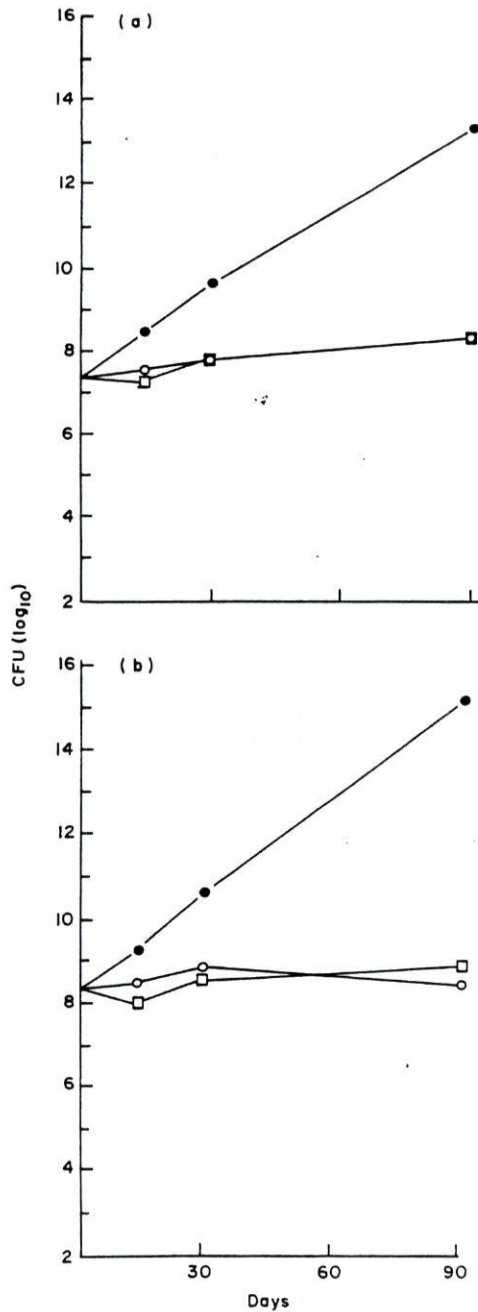


Fig. 6. CFU counts in the spleen (a) and liver (b) of BALB/c (●), BALB/c.Bcg<sup>+</sup> (C.D2) (○), and DBA/2 (□) mice intravenously infected with  $2 \times 10^8$  CFU of *M. avium*. Each point represents the mean of four mice. The s.d. of the geometric mean of CFU was smaller than 5% of the mean for any time point and was not depicted for sake of clarity.

such enhancement in nitrite production by their peritoneal macrophages in the presence of LPS (Fig. 8b).

Resident peritoneal macrophages from uninfected BALB/c and C.D2 mice were cultured *in vitro* at high density of adherent cells (resulting in confluent macrophage monolayers) and infected with *M. avium* giving an infection ratio of about 1 bacterium:2 macrophages. This protocol avoided the problem of extracellular growth of the bacilli which did not occur in the 96 h of the assay. The slight differences in the initial CFU counts were also not important since there were never infection ratios

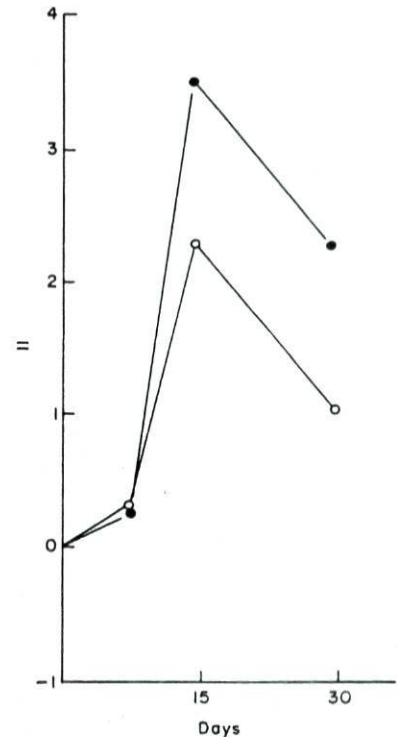


Fig. 7. Development of non-specific resistance to listeria in BALB/c (●) and C.D2 (○) mice intravenously infected with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium*.

above 1:1. BALB/c macrophages allowed bacterial growth resulting in a 2.5-fold increase in the CFU counts in 96 h of the infection (Fig. 9a). Macrophages from C.D2 were more bacteriostatic than those from BALB/c allowing for only a 1.6-fold increase in the CFU counts (Fig. 9b). The daily addition of spleen cell-conditioned medium containing macrophage activation factors led to an increase in the bacteriostatic capacities of the macrophages from both mouse strains (Fig. 9a, b). However, the relative differences between the two strains were still maintained, BALB/c macrophages allowing a 1.7-fold increase in CFU counts compared with a 1.2-fold increase with C.D2 macrophages.

## DISCUSSION

Mycobacteria are intracellular parasites residing inside the macrophages of the infected host (Edwards & Kirkpatrick, 1986). The protection against these bacteria appears to depend upon mechanisms of cell-mediated immunity involving the recognition of bacterial antigens by T cells and the activation of the phagocytes by T cell-derived lymphokines (Edwards & Kirkpatrick, 1986; Gaugas & Rees 1968; Mackaness, 1964; Patterson & Youmans, 1970; Rook *et al.*, 1985). In addition to these immune pathways, innate resistance traits are able to affect the initial growth of these bacteria before the development of the acquired phase of immunity (Buschman *et al.*, 1988). The best studied of these traits is under the regulation of a gene located in the mouse chromosome 1, named *Bcg* (Forget *et al.*, 1981; Gros, Skamene & Forget, 1983), that probably is the same as those named *Lsh* (Bradley *et al.*, 1979) and *Irv* (Plant & Glynn 1979). The *Bcg* gene controls some as yet unidentified macrophage function that is manifested by the anti-mycobacterial

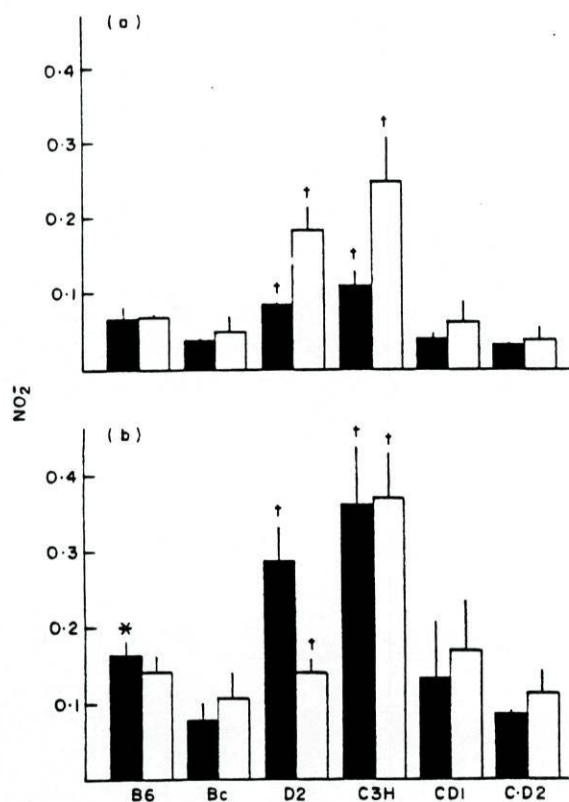


Fig. 8. Production of nitrite by peritoneal macrophages from C57BL/6 (B6), BALB/c (Bc), C3H/He (C3), DBA/2 (D2), CD-1 and C.D2 mice intraperitoneally infected with  $2.5 \times 10^8$  CFU of *M. avium* for 15 (closed columns) or 30 (open columns) days. Nitrite was detected in the culture supernatants of adherent cells incubated for 24 h in RPMI medium plus 10% FCS in the absence (a) or presence (b) of 10 ng of LPS/ml. Each column represents the mean value for three mice. Comparison between infected and non-infected mice: statistically significant \* $P < 0.01$ , † $P < 0.05$ ; Mann-Whitney *U*-test.

(Stach *et al.*, 1984) and oxidative activity (Denis *et al.*, 1988c) of resident macrophages as well as by effects on the immune response (Buschman & Skamene, 1988; Denis *et al.*, 1988a, b).

We show here that two groups of mouse strains can be distinguished based on the resistance to *M. avium* infection. The susceptible animals allowed a progressive bacterial growth leading to the death of the animals whereas the resistant mice controlled the infection by inhibiting bacterial growth and showed no signs of disease. Of the seven inbred strains of mice that we studied, the four *M. avium*-susceptible strains bore the *Bcg*<sup>-</sup> allele whereas the three resistant strains were *Bcg*<sup>+</sup>. These results extend the data obtained by other authors with *M. avium* (Orme *et al.*, 1986; Stokes *et al.*, 1986) and *M. intracellulare* (Goto *et al.*, 1984), namely by showing that the *Bcg* gene is the major determinant of resistance against *M. avium* in the control of the infection using the pair of congenic mouse strains, BALB/c and BALB c.*Bcg*<sup>+</sup> (C.D2) mice (Potter *et al.*, 1983). The presence of the chromosome 1 segment bearing the *Bcg*<sup>+</sup> gene rendered BALB/c mice as resistant to the infection as the donor DBA/2 strain. However, other genes may still play a role in resistance to these bacteria (Orme *et al.*, 1986). Unlike in the BCG model (Forget *et al.*, 1981; Gros *et al.*, 1983), where the *Bcg*<sup>-</sup> allele is associated with bacterial growth only in the initial phase of the infection, we found that the effects of the *Bcg*<sup>-</sup> gene

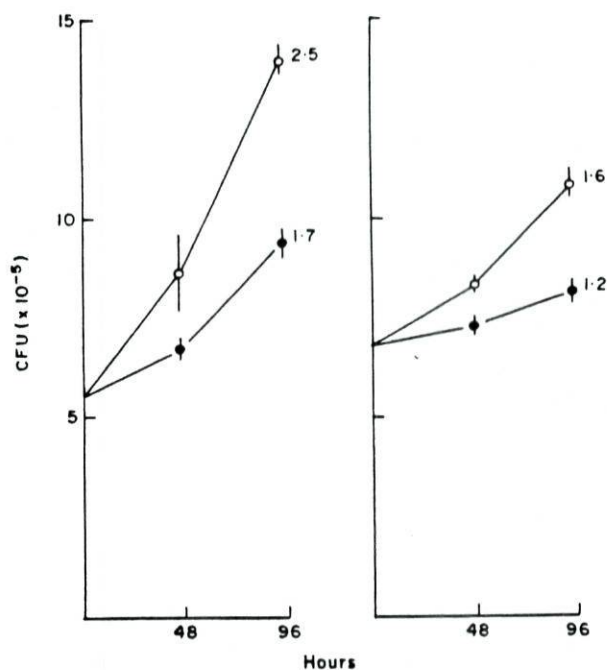


Fig. 9. CFU counts of *M. avium* in infected macrophage monolayers from BALB/c (a) or C.D2 (b) mice, cultured up to 96 h in RPMI medium plus 10% FCS in the absence (○) or the presence (●) of 25% of conditioned medium. Each value represents the mean  $\pm$  1 s.d. of three determinations. The experiment was repeated three times giving reproducible results. Differences in the numbers of CFU at  $t = 0$  in the two mouse strains did not account for the differences in the growth rate since they were also observed when CFU numbers were the same at  $t = 0$  (other experiments).

allowing *M. avium* proliferation were observed both in the initial phase of infection where the innate resistance mechanisms are important and at later periods of infection after the acquisition of CMI.

We looked at the level of macrophage activation during the *M. avium* infection since this parameter is thought to be the effector mechanism in resistance to mycobacterial infection (Patterson & Youmans, 1970; Rook *et al.*, 1985; Edwards & Kirkpatrick, 1986) and because it reflects the degree of immune response that takes place in the infected host (North 1974). We studied three parameters of macrophage activation in infected mice of six strains including the congenic pair, BALB/c and CD-2. Our results showed that the levels of macrophage activation for non-specific antibacterial activity and  $H_2O_2$  production were as high or even higher among susceptible strains as they were in strains resistant to *M. avium* thus showing that susceptibility to these mycobacteria was not due to a lack of macrophage activation. The secretion of reactive nitrogen intermediates, which has been reported to be enhanced following immunological activation of macrophages (Ding *et al.*, 1988; Stuehr & Marletta, 1985), was not associated with any pattern of resistance/susceptibility to infection by *M. avium*. It is thus apparent that this bacterium is quite resistant to the antibacterial activity of the activated macrophage as was also found by others (Orme & Collins 1983; Stokes & Collins 1988). It must be stressed, however, that any of the three parameters of macrophage activation studied represent markers of such functional macrophage alterations but may not represent the molecular mechanisms of antimycobacterial activity. Indeed, it has been

suggested that reactive oxygen intermediates are not involved in the macrophage control of mycobacterial growth (Flesch & Kaufmann 1988). As for the NO<sub>2</sub> ions, there are no data concerning their action on mycobacteria even though they were shown to be active against fungi (Granger *et al.*, 1988). Moreover, there are numerous reports on the dissociation of the parameters of macrophage activation. Thus, it has been shown that tumoricidal and listericidal activities are independently regulated in exudate peritoneal macrophages of mice (Campbell *et al.*, 1988) and that antibacterial activities against different species of bacteria are dissociated (van Dissel *et al.*, 1987). It must also be taken into account that we measured macrophage activation of a population of cells that had a minority of infected macrophages. Thus, it cannot be excluded that the infected cells might not exhibit the same general pattern of macrophage activation.

We showed that congenitally athymic C57BL/6 nude mice and T cell-depleted BALB/c mice developed a smaller degree of NSR to listeria compared with normal littermates, suggesting that at least partially, macrophage activation involves T cell-dependent mechanisms in agreement with previous reports (North, 1974). This would argue in favour of the hypothesis that susceptibility to *M. avium* is not due to the lack of an efficient immune response leading to macrophage activation. The susceptibility to infection could be due to either a defective macrophage antimicrobial function or to the resistance of *M. avium* to the antibacterial activity of the macrophages as suggested before. Likewise, the lack of growth of *M. avium* in resistant mice could be explained by the presence of an efficient antibacterial function in *Bcg*<sup>r</sup> macrophages or by the lack of a suitable environment for bacterial growth.

Our observation that the macrophage activation is directly proportional to the bacterial load in the infected mice prompts us to speculate that in the presence of higher amounts of antigen or when innate susceptibility allows bacterial proliferation, the T cells are more active in the regulation of the macrophage functions, or mycobacterial products by themselves directly activate macrophages.

The differences in resistance to *M. avium* between mice were, at least partially, mimicked *in vitro* using cultures of resident peritoneal macrophages. Unlike Stokes & Collins (1988), we found that Con A-induced lymphokines could activate mycobacteriostatic activity in resident peritoneal macrophages of distinct innate resistance to mycobacteria. Interestingly, the differences between resistant and susceptible animals were maintained after *in vitro* activation by spleen cell-derived lymphokines. Since the activating stimulus in the macrophage culture was the same for the two cell populations, this result supports the notion that the susceptibility is indeed due to some defective antibacterial function of *Bcg*<sup>s</sup> macrophages that cannot be completely overcome by immune-mediated activation. Such function could be related either directly to an effector molecule or to the triggering of the antimicrobial mechanisms.

In conclusion we have shown that the *Bcg* gene plays an important role in the control of the resistance to *M. avium* infection in mice and we hypothesize that this resistance depends on macrophage functions rather than on the immune response and that the activation of these phagocytes cannot completely overcome, as happens with the BCG bacilli, the inability of *Bcg*<sup>s</sup> macrophages to control bacterial proliferation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the Instituto Nacional de Investigação Científica, the Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica and the Damien Foundation. The authors are indebted to Mr Jorge Pedrosa for skillful technical assistance and to Dr M. T. Silva and A. Águas for helpful discussions.

## REFERENCES

- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**, 283.
- APPELBERG, R., SOARES, R., FERREIRA, P. & SILVA, M.T. (1989) Induction of non-specific immunosuppression in mice by mycobacterial infections and its relation to macrophage activation. *Scand. J. Immunol.* **30**, 165.
- BRADLEY, D.J., TAYLOR, B.A., BLACKWELL, J., EVANS, E.P. & FREEMAN, J. (1979) Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. exp. Immunol.* **37**, 7.
- BUSCHMAN, E., APT, A.S., NICKONENKO, B.V., MOROZ, A.M., AVERBAKH, M.H. & SKAMENE, E. (1988) Genetic aspects of innate resistance and acquired immunity to mycobacteria in inbred mice. *Springer Semin. Immunopathol.* **10**, 319.
- BUSCHMAN, E. & SKAMENE, E. (1988) Immunological consequences of innate resistance and susceptibility to BCG. *Immunol. Lett.* **19**, 199.
- CAMPBELL, P.A., CANONO, B.P. & COOK, J.L. (1988) Mouse macrophages stimulated by recombinant gamma interferon to kill tumor cells are not bactericidal for the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58**, 1371.
- DENIS, M., BUSCHMAN, E., FORGET, A., PELLETIER, M. & SKAMENE, E. (1988a) Pleiotropic effects of the *Bcg* gene. II. Genetic restriction of responses to mitogens and allogeneic targets. *J. Immunol.* **141**, 3988.
- DENIS, M., FORGET, A., PELLETIER, M. & SKAMENE, E. (1988b) Pleiotropic effects of the *Bcg* gene. I. Antigen presentation in genetically susceptible and resistant congenic mouse strains. *J. Immunol.* **140**, 2395.
- DENIS, M., FORGET, A., PELLETIER, M. & SKAMENE, E. (1988c) Pleiotropic effects of the *Bcg* gene: III. Respiratory burst in *Bcg*-congenic macrophages. *Clin. exp. Immunol.* **73**, 370.
- DING, A.H., NATHAN, C.F. & STUEHR, D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407.
- EDWARDS, D. & KIRKPATRICK, C.H. (1986) The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. resp. Dis.* **134**, 1062.
- FLESCH, I.E.A. & KAUFMANN, S.H.E. (1988) Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* **56**, 1464.
- 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.
- GAUGAS, J.M. & REES, R.J.W. (1968) Enhancing effect of antilymphocytic serum on mycobacterial infections in mice. *Nature*, **219**, 408.
- GOTO, Y., NAKAMURA, R.M., TAKAHASHI, H. & TOKUNAGA, T. (1984) Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Infect. Immun.* **46**, 135.
- GRANGE, J.M. & YATES, M.D. (1986) Infections caused by opportunist mycobacteria: a review. *J. R. Soc. Med.* **79**, 226.
- GRANGER, D.L., HIBBS, J.B., JR., PERFECT, J.R. & DURACK, D.T. (1988) Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* **81**, 1129.
- GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131.

- GROS, P., SKAMENI, E. & FORGET, A. (1983). Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.* **131**, 1966.
- MACKANESS, G.B. (1964). The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* **120**, 105.
- NORTH, R.J. (1974). T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **10**, 66.
- NORTH, R.J. & SPITALNY, G.L. (1981). Determination of macrophage-mediated antibacterial resistance. In *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes* (ed. by D. O. Adams, P. J. Edelson & H. Koren) p. 1011. Academic Press, New York.
- ORME, I.M. (1988). Anergy in experimental mouse models of mycobacterial infection. In *Mycobacterium tuberculosis. Interactions with the Immune System* (ed. by M. Bendinelli & H. Friedman) p. 207. Plenum Press, New York.
- ORME, I.M. & COLLINS, F.M. (1983). Resistance of various strains of mycobacteria to killing by activated macrophages *in vivo*. *J. Immunol.* **131**, 1452.
- ORME, I.M. & COLLINS, F.M. (1984). Immune response to atypical mycobacteria: immunocompetence of heavily infected mice measured *in vivo* fails to substantiate immunosuppression data obtained *in vitro*. *Infect. Immun.* **43**, 32.
- ORME, I.M., STOKES, R.W. & COLLINS, F.M. (1986). Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. *Infect. Immun.* **54**, 56.
- PATTERSON, R.J. & YOUNG, G.P. (1970). Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* **1**, 600.
- PLANT, J. & GLYNN, A.A. (1979). Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin. exp. Immunol.* **37**, 1.
- POTTER, M., O'BRIEN, A.D., SKAMENI, E., GROS, P., FORGET, A., KONGSHAVN, P.A.L. & WAX, J.S. (1983). A BALB/c congenic strain of mice that carries a genetic locus (*Jty<sup>r</sup>*) controlling resistance to intracellular parasites. *Infect. Immun.* **40**, 1234.
- ROOK, G.A.W., CHAMPION, B.R., STELLI, J., VARIY, A.M. & STANFORD, J.L. (1985). I-A restricted activation by T cell lines of anti-tuberculosis activity in murine macrophages. *Clin. exp. Immunol.* **59**, 414.
- RUCH, W., COOPER, P.H. & BAGGIOLINI, M. (1983). Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages and neutrophils with homovanilic acid and horse-radish peroxidase. *J. Immunol. Methods.* **63**, 347.
- STACH, J.-L., GROS, P., FORGET, A. & SKAMENI, E. (1984). Phenotypic expression of genetically-controlled natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.* **132**, 888.
- STOKES, R.W. & COLLINS, F.M. (1988). Growth of *Mycobacterium avium* in activated macrophages harvested from inbred mice with differing innate susceptibilities to mycobacterial infection. *Infect. Immun.* **56**, 2250.
- STOKES, R.W., ORME, I.M. & COLLINS, F.M. (1986). Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. *Infect. Immun.* **54**, 811.
- STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 7738.
- TSUYUGUCHI, I., SHIRATSUCHI, H., OKUDA, Y. & YAMAMOTO, Y. (1988). An analysis of *in vitro* T cell responsiveness in nontuberculous mycobacterial infection. *Chest.* **94**, 822.
- VAN DISSEL, J.T., STIKKELBROECK, J.J.M., VAN DER BARSELAAR, M.T., SLUITER, W., LEIJH, P.C.J. & VAN FURTH, R. (1987). Divergent changes in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **139**, 1665.
- WATSON, S.R. & COLLINS, F.M. (1980). Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria. *Immunology.* **39**, 367.
- WATSON, S.R. & COLLINS, F.M. (1981). The specificity of suppressor T cell induced by chronic *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clin. exp. Immunol.* **43**, 10.

**Artigo nº 2**

## Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence

R. APPELBERG\*†, A. SARMENTO\* & A. G. CASTRO\* \*Centro de Citologia Experimental and †Abel Salazar Biomedical Sciences Institute, University of Porto, Porto, Portugal

(Accepted for publication 21 March 1995)

### SUMMARY

The relative virulence of different isolates of *Mycobacterium avium* has been linked to their capacity to trigger the secretion of TNF from the macrophages they infect. Smooth opaque (SmOp) variants of *Myco. avium* have been shown to trigger higher expression of TNF- $\alpha$  by macrophages *in vitro* than the smooth transparent (SmTr) variants. To analyse the role of TNF in resistance to infection by *Myco. avium*, we studied the infection by two different morphotypes of strain 2.151 of *Myco. avium* both *in vitro* and *in vivo* in the presence or absence of neutralizing antibodies to TNF. No effects were found *in vitro* regarding the growth of either isolate of *Myco. avium*. *In vivo*, only the virulent SmTr morphotype showed enhanced growth in the presence of the neutralizing antibodies. This enhancement occurred relatively late when priming for TNF secretion *in vivo* was evident. Among four isolates of *Myco. avium*, three virulent ones induced a marked priming for TNF release and one avirulent strain did not. *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, which is very active in inducing TNF release due to its lipoarabinomannan moiety, was used to compare with the previous results. The growth of H37Ra in macrophages was increased *in vitro* by the neutralization of TNF and neutralization of either TNF and/or interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) enhanced the *in vivo* proliferation of this microbe in the spleen and liver of infected animals, whereas only the combination of both anti-TNF and anti-IFN- $\gamma$  enhanced bacterial proliferation in the lung. We conclude that resistance to the avirulent strains of *Myco. avium* did not involve TNF, but rather antimicrobial mechanisms expressed constitutively in the mononuclear phagocytes. In contrast, TNF plays an important role in the control of *Myco. tuberculosis* H37Ra infection.

**Keywords** tumour necrosis factor-alpha *Mycobacterium avium* *Mycobacterium tuberculosis* macrophages innate resistance

### INTRODUCTION

The virulence of mycobacteria is very variable, depending not only on the mycobacterial species but also on the strains or colonial morphotypes of a given species. *Mycobacterium avium* is an opportunistic infectious agent in humans, infecting mainly AIDS patients [1]. Many strains are able to proliferate in animals to a great extent, whereas others are slowly eliminated [2,3]. In the mouse model of infection, the growth of *Myco. avium* depends on the host genetic background and on the bacterial strain and colonial form. Mice expressing the *Bcg<sup>f</sup>* allele are naturally resistant to infection by *Myco. avium* [4,5]. Naturally susceptible mice harboring the *Bcg<sup>s</sup>* allele may still eliminate avirulent strains of *Myco. avium*, namely the smooth opaque (SmOp) morphotypes, but become progressively infected with highly virulent strains, or chronically infected

with *Myco. avium* of intermediate virulence [3,4,6–9]. Thus, while avirulent strains are equally eliminated from *Bcg<sup>s</sup>* and *Bcg<sup>f</sup>* strains and, furthermore, are not dependent on an intact immune system for elimination, virulent strains show differences in their control among mouse strains, and depend on T cells for their control [4,6–9]. Similar variation in virulence among strains has been found in *Myco. tuberculosis*, one of the most virulent species for man and many experimental animals. In the 1940s, avirulent strains of *Myco. tuberculosis* were isolated from clinical isolates, such as the case of the strain H37Ra [10]. The basis of the lack of virulence has recently begun to be understood [11,12].

The colonial morphology types of *Myco. avium* are associated with the presence of particular glycolipids exposed on the outer surface of the cell wall of the bacteria [13–15]. *Mycobacterium tuberculosis* also expresses different glycolipids that differ according to the strains under study. Thus, virulent strains have different lipoarabinomannan molecules compared

Correspondence: Rui Appelberg, Centro de Citologia Experimental, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal.

with the avirulent H37Ra strain [11,12]. It has been shown that these differences in glycolipid structure are associated with differences in the triggering of TNF- $\alpha$  secretion following infection of the macrophage [11,12,16]. On the basis of these latter observations, it has been speculated that the virulence of a particular mycobacterium depends on its ability to avoid the triggering of TNF secretion when infecting a mononuclear phagocyte.

The morphotypic variation from smooth transparent (SmTr) to SmOp is most often associated with loss of virulence [3]. Thus, we chose to study two isogenic morphotype variants, and tested the hypothesis that avirulent SmOp *Mycobacterium avium* are eliminated from the host because of their ability to trigger TNF- $\alpha$  secretion to a greater extent than virulent SmTr organisms. We also studied an avirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to look at another example where such a hypothesis has been put forward.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Female BALB/c mice were purchased from the Gulbenkian Institute (Oeiras, Portugal), kept under conventional housing, given commercial chow and acidified water *ad libitum*, and used at 8–12 weeks of age.

### Bacteria

*Mycobacterium avium* 2.151, an AIDS-derived isolate, was obtained from Dr John Belisle (Colorado State University, Fort Collins, CO) in two colonial forms, SmTr and SmOp. *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra was provided by Dr F. Portaels (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium). Bacteria were grown in 7H9 medium supplemented with ADC (Difco, Detroit, MI) until mid-log phase, harvested by centrifugation, suspended in saline/0.04% Tween 80 (Sigma, St Louis, MO), briefly sonicated to disperse bacterial clumps (15 s at 50 W in a Branson sonifier), and frozen in aliquots until use.

### Reagents and antibodies

Tissue culture medium was from Gibco (Paisley, UK). Macrophage culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 10 mM HEPES buffer (complete DMEM). No antibiotics were used in any step. The MP6-XT22 and XMG1.2 hybridomas were grown in ascites in HSD nude mice and antibodies were purified by affinity chromatography using an EconoPac Ig column (BioRad, Richmond, CA) or by ammonium sulphate precipitation. The GL113 isotype control (IgG1) MoAb with an irrelevant specificity (anti- $\beta$ -galactosidase) was used to control for the administration of xenogenic molecules.

### Study of the infection in vivo

Mice were infected intravenously with  $10^6$  colony-forming units (CFU) of each strain of *Mycobacterium avium*, and the infection was monitored for 30 days by counting viable bacteria in the spleens and livers of infected animals. For this purpose, groups of four mice were killed by cervical dislocation, their organs were aseptically collected, ground in a 0.04% Tween 80 solution in water, serially diluted and plated onto 7H10 agar plates in duplicate. The number of colonies were counted 10–15 days

later after incubating the plates at 37 °C. Mice were given 2 mg of either anti-TNF (MP6-XT22) or isotype control (GL113) antibodies on days 0 and 15 of infection. Previous work has shown that antibodies with irrelevant specificities do not alter the course of the infection even when given every 2 weeks for 3 months in doses up to 4 mg/animal.

*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra was inoculated intravenously into mice at doses of  $10^5$  or  $10^6$  CFU/animal. Mice were treated intraperitoneally with 2 mg of anti-TNF and/or anti-IFN- $\gamma$  antibodies or the isotype control at days 0 and 15 of infection. Bacterial growth was monitored as described for *Mycobacterium avium*.

### Study of the infection in cultured macrophages

Macrophages were cultured from bone marrow cells of BALB/c mice in the presence of L929 cell-conditioned medium as described [17]. Macrophages were infected on day 10 of culture with the bacteria, incubated for 2 h and washed extensively to remove extracellular bacteria. Infection was followed for up to 7 days as described [17]. Each well contained 1 ml of medium with or without 50  $\mu$ g of antibody/well. This amount of antibody was shown to block all TNF bioactivity.

### In vitro secretion of TNF

Bone marrow-derived macrophages were infected with  $10^6$  CFU (multiplicity of infection = 2:1) and the supernatants (1 ml/well from 24-well plates) were collected 4 days later and analysed for TNF bioactivity as described below.

### In vivo secretion of TNF

To measure the priming of the macrophages *in vivo* for the secretion of TNF, infected mice were inoculated for 2 h with 50  $\mu$ g of *Escherichia coli* endotoxin (O26:B6 serotype; Sigma) and killed by exsanguination. Sera from each mouse was diluted 1:10 in complete DMEM, sterilized by filtration and used to assess the amount of biologically active TNF using the L929 lysis assay. Cells were incubated in 96-well flat-bottomed plates with serial dilution of each sample in the presence of 1  $\mu$ g of actinomycin D/ml, and cell viability was measured 24 h later by incubating the monolayers with MTT. One unit of TNF corresponds to the amount of TNF required to produce a 50% reduction in the amount of MTT reduction.

### Statistical analysis

*In vivo* infection data are means of the results from four mice per time point. Data from *in vitro* culture are means from four wells. Data were compared using Student's *t*-test.

## RESULTS

The secretion of TNF- $\alpha$  was studied in bone marrow-derived macrophages infected with two colonial morphotypes of strain 2.151 as well as another avirulent strain of *Mycobacterium avium* (strain 1983) or the avirulent H37Ra strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Macrophages were infected with  $10^6$  CFU of the different mycobacteria and the amount of biologically active TNF present in the supernatants of the macrophages was tested at day 4 of infection. Neither variant of strain 2.151 induced secretion of TNF to detectable levels (sensitivity limit of 10 U/ml) compared with H37Ra ( $30.0 \pm 14.1$  U/ml) or the avirulent strain of *Mycobacterium avium*, strain 1983 ( $60.0 \pm 34.6$  U/ml).



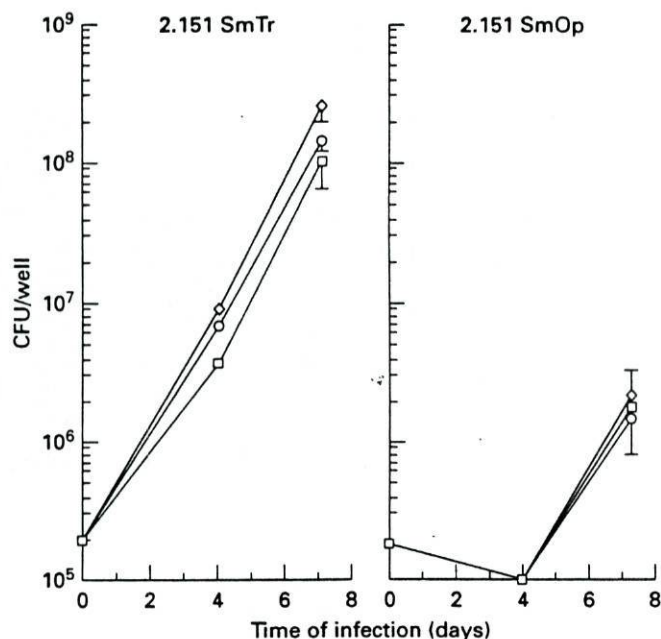


Fig. 1. Growth of *Mycobacterium avium* 2.151 *in vitro* in bone marrow-derived macrophages. Smooth transparent (SmTr) and smooth opaque (SmOp) variants were used to infect macrophage monolayers, and infection was monitored for up to 7 days in the presence of anti-TNF antibodies ( $\diamond$ ), isotype control immunoglobulin ( $\circ$ ) or nil ( $\square$ ). Each time point represents the mean  $\pm$  s.d. of three wells. There were no statistically significant differences between groups. CFU, Colony-forming unit.

Since we were unable to detect TNF which still could be having an autocrine effect on the macrophage, we then analysed *in vitro* the effects of the neutralization of TNF on proliferation of the two morphotypes of the 2.151 strain of *Myco. avium* growing inside bone marrow-derived macrophages. As previously reported [17], the virulent SmTr variant grew progressively in the macrophages, whereas the avirulent SmOp did not grow during the initial 4 days of infection and proliferated to a limited extent afterwards (Fig. 1). Neither the growth of the SmTr nor of the SmOp morphotypes was affected by co-incubation of the cells with anti-TNF antibodies or the isotype control MoAb (Fig. 1).

Table 1. Amounts of biologically active TNF ( $\log_{10}$  units of TNF/ml of serum) in the sera of endotoxin-treated mice infected intravenously with  $10^6$  colony-forming units (CFU) of *Mycobacterium avium* or *Myco. tuberculosis* H37Ra for 2 or 4 weeks

Strain	2 weeks	4 weeks
<i>Myc. avium</i> 2447 SmTr	4.11 $\pm$ 0.37	5.45 $\pm$ 0.07
<i>Myc. avium</i> 25291 SmTr	4.11 $\pm$ 0.00	5.34 $\pm$ 0.25
<i>Myc. avium</i> 2.151 SmTr	4.01 $\pm$ 0.30	4.95 $\pm$ 0.17
<i>Myc. avium</i> 2.151 SmOp	3.66 $\pm$ 0.15	2.80 $\pm$ 0.34
<i>Myc. tuberculosis</i> H37Ra	4.69 $\pm$ 0.15	4.61 $\pm$ 0.24

SmTr, Smooth transparent; SmOp, smooth opaque.

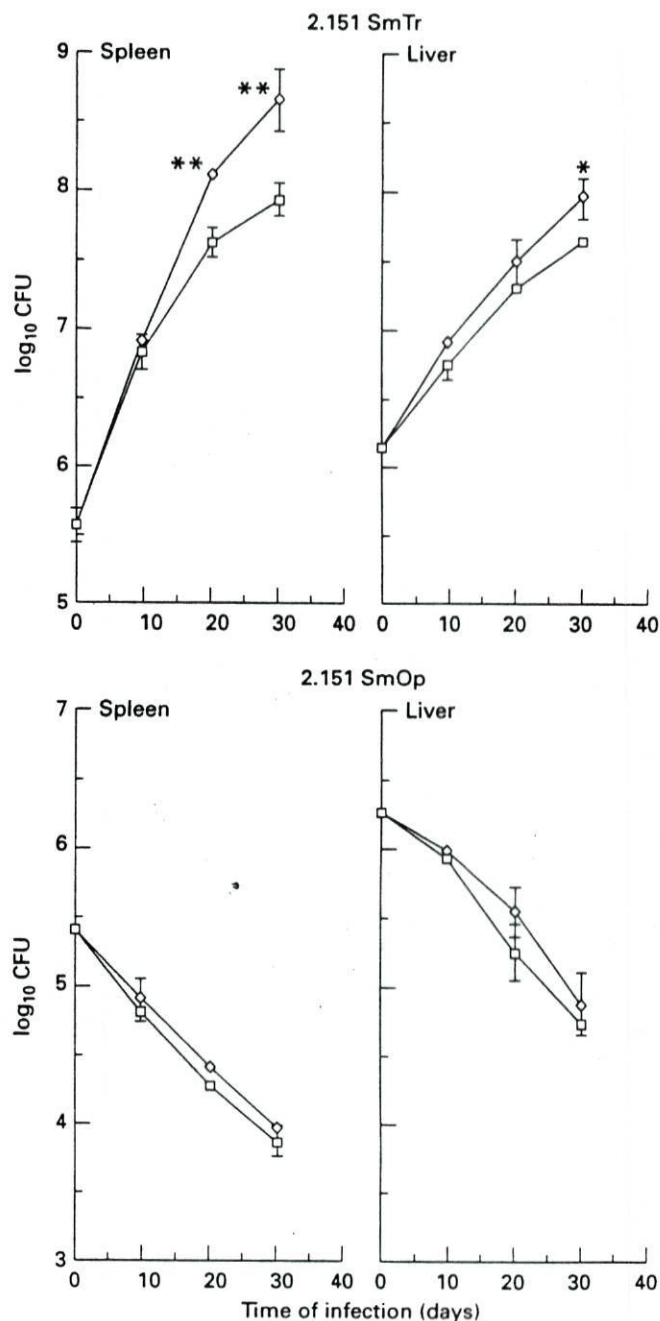


Fig. 2. Growth of *Mycobacterium avium* 2.151 *in vivo* in the spleen and liver of BALB/c animals infected with  $10^6$  colony-forming units (CFU) of either the smooth transparent (SmTr) or the smooth opaque (SmOp) variant. Mice were treated intraperitoneally every 2 weeks with 2 mg of either anti-TNF ( $\diamond$ ) or isotype control ( $\square$ ) antibodies. Each time point represents the geometric mean of the CFU values from four mice  $\pm$  s.d. Statistically significant differences: \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01.

When mice were infected intravenously with  $10^6$  CFU of either variant of the 2.151 strain, there was an extensive proliferation of the SmTr variant and a slow elimination of the SmOp isolate (Fig. 2). Whereas the neutralization of TNF during the course of infection by the SmOp variant did not affect elimination of the bacteria, there was a statistically significant enhancement of bacterial proliferation of the

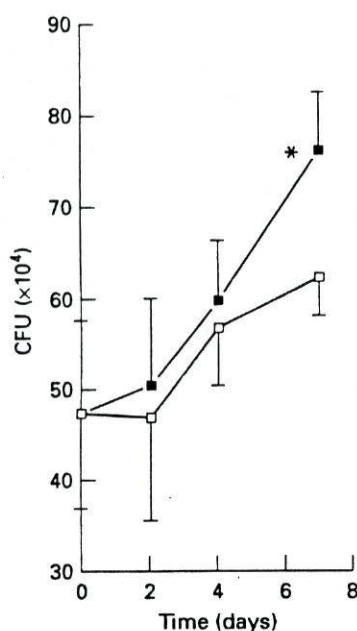


Fig. 3. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra *in vitro* in bone marrow-derived macrophages. Infection was monitored for up to 7 days in the presence of anti-TNF antibodies (■), or isotype control immunoglobulin (□). Each time point represents the mean  $\pm$  s.d. from three wells. Statistically significant differences: \* $P < 0.01$ . CFU, Colony-forming units.

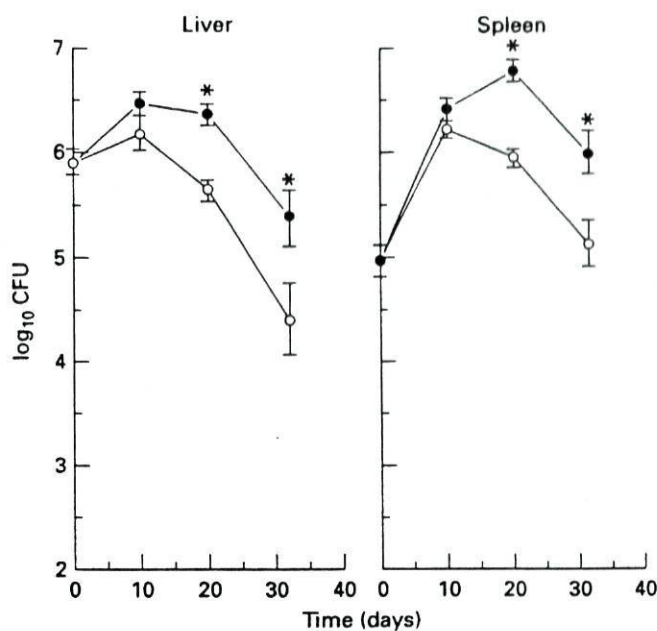


Fig. 4. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra *in vivo* in the spleen and liver of BALB/c animals infected with  $10^6$  colony-forming units (CFU) of the bacteria. Mice were treated intraperitoneally every 2 weeks with 2 mg of either anti-TNF (●) or isotype control (○) antibodies. Each time point represents the geometric mean of the CFU values from four mice  $\pm$  s.d. Statistically significant differences: \* $P < 0.01$ .

SmTr morphotype after day 10 in the spleen and liver of infected animals (Fig. 2).

To look for *in vivo* priming for TNF secretion in mice infected with the different mycobacteria, mice were infected with the SmTr and SmOp colonial variants of strain 2.151 of *Myc. avium*, two other virulent strains of *Myc. avium* (strain 25291, highly virulent for mice, and strain 2447, of intermediate virulence for mice) and the avirulent H37Ra strain of *Myc. tuberculosis*. At 2 and 4 weeks of infection, the animals were treated intraperitoneally with 50  $\mu$ g of endotoxin, and sera were collected 2 h later and analysed for the bioactivity of TNF. As shown in Table 1, animals infected with the SmTr variants of *Myc. avium* had higher levels of TNF in their post-endotoxin sera than animals infected with the avirulent SmOp variant.

Since the H37Ra strain of *Myc. tuberculosis* has been shown to be a powerful trigger of TNF expression and secretion [11,12], we decided to analyse the effect of TNF neutralization to check the negative results obtained with the avirulent strain of *Myc. avium*. In contrast to the 2.151 SmOp strain, *in vitro* neutralization of TNF led to a slight enhancement of growth of the bacilli in treated macrophages (statistically significant at day 7) (Fig. 3). *In vivo*, *Myc. tuberculosis* H37Ra was able to proliferate to some extent in the spleen, liver, and lung of infected mice (Figs 4 and 5), showing that this strain is not completely devoid of virulence for BALB/c animals. TNF neutralization during the *in vivo* infection led to an increase of bacterial proliferation of H37Ra that was obvious at day 20 of infection, at a time when some elimination of the mycobacteria was already starting to occur in control animals (Fig. 4).

To determine whether TNF production during H37Ra

infection was associated with innate mechanisms of protection, or was occurring after immune priming of macrophages for TNF secretion [7], we tested H37Ra-infected mice for TNF production *in vivo* after an endotoxin challenge [7]. We found that infection by H37Ra also led to important priming at 2 and 4 weeks of infection (Table 1).

Finally, we evaluated whether the enhancement of growth

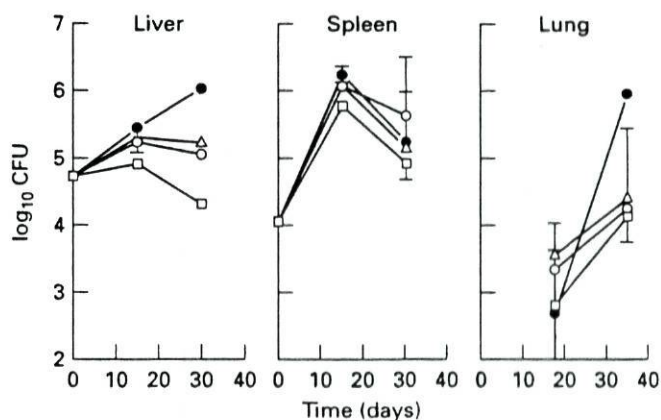


Fig. 5. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra *in vivo* in the spleen, liver, and lung of BALB/c animals infected with  $5 \times 10^4$  colony-forming units (CFU) of the bacteria. Mice were treated intraperitoneally every 2 weeks with 2 mg of either anti-TNF ( $\Delta$ ), anti-IFN- $\gamma$  ( $\circ$ ), both antibodies ( $\bullet$ ) or isotype control antibodies ( $\square$ ). Each time point represents the geometric mean of the CFU values from four mice  $\pm$  s.d. Statistical analysis is presented in the text.

by anti-TNF antibodies was further increased by the neutralization of IFN- $\gamma$  in view of the fact that the latter cytokine is involved in priming for TNF secretion [7]. As shown in Fig. 5, there was a cooperation between TNF and IFN- $\gamma$  in the induction of killing of H37Ra in the liver and, albeit to a lesser degree, in the spleen of infected mice. Anti-IFN- $\gamma$  antibodies, with or without anti-TNF antibodies, significantly enhanced bacterial proliferation in the liver ( $P < 0.01$  at days 15 and 30) and in the spleen ( $P < 0.01$  at day 15 and  $P < 0.05$  at day 30). Anti-TNF antibodies alone enhanced bacterial proliferation in the liver ( $P < 0.01$  at days 15 and 30). Single antibody treatments did not affect H37Ra growth in the lung, but combined administration of both antibodies was able to enhance bacterial proliferation more than 10-fold at day 30 of infection ( $P < 0.01$ ).

### DISCUSSION

As previously shown, the two morphotypes of strain 2.151 behaved differently after infecting mice or isolated macrophages. Infection by SmOp variants of *Mycobacterium avium* was controlled very early, even before the bacteria were able to proliferate. This fact would support a role for a macrophage product triggered very early (i.e. before the onset of an immune response to the infectious organism) by the avirulent SmOp variant, namely TNF- $\alpha$ . However, *in vitro*, neither the avirulent variant nor the more virulent SmTr variants triggered TNF- $\alpha$  secretion, thus conflicting with the data obtained previously using an ELISA technique to detect secreted cytokine [16]. It was still possible that TNF was being produced and acted in an autocrine loop on the infected macrophages. We therefore tested the hypothesis that the early secretion of TNF by macrophages infected with avirulent strains of *Mycobacterium avium* might be able to induce control of the bacterial proliferation from the beginning of the infection. We were unable to enhance the growth of the SmOp strains either *in vitro* or *in vivo* by neutralizing TNF- $\alpha$ . We thus found no evidence to substantiate the hypothesis raised previously. The neutralization of TNF- $\alpha$  in cultures of macrophages infected with the virulent SmTr morphotype did not affect its growth either. However, the *in vivo* proliferation of this latter isolate was enhanced by neutralization of the endogenously produced TNF- $\alpha$ . This enhancement was evident after the first 2 weeks of infection, suggesting that TNF production needed to be primed before detectable levels of this cytokine were evident and able to induce some bacteriostasis. When we analysed the *in vivo* ability to secrete TNF- $\alpha$  after stimulation with a potent agonist of TNF- $\alpha$  secretion, endotoxin, we found that only the virulent strains of *Mycobacterium avium* were able to induce such priming. We showed elsewhere [7] that the priming of the macrophages that occurs *in vivo* depends on the endogenous production of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). We therefore propose that, in the presence of proliferating bacteria, immune cells (T cells or natural killer (NK) cells) are induced to secrete IFN- $\gamma$  and, in that way, prime the macrophages. The ability to secrete TNF then increases and that cytokine exerts, in an autocrine or paracrine way, its antimicrobial function.

Preliminary results comparing two other strains of *Mycobacterium avium* have, however, shown that early TNF production induced by avirulent strains may, at least partly, account for the lower virulence exhibited by some strains of *Mycobacterium avium*

(A. Sarmiento and R. Appelberg, manuscript in preparation). Thus, the hypothesis raised elsewhere [16], relating avirulence to enhanced TNF triggering, still applies to some situations of *Mycobacterium avium* infection. We have to consider that, in addition to that explanation, other mechanisms still operate dictating the outcome of the interaction between that microbe and its host. Thus, the basis of the lack of virulence of the particular SmOp strain studied here does not relate to the induction of TNF, but may rather depend, in our view, on the innate susceptibility of these strains to antimicrobial mechanisms of the macrophage expressed constitutively with no need for activation by cytokines. Further work should thus be focused on the microbiology of these strains, to test which is the basis of the lack of virulence. In this respect, it has been shown that SmOp strains are better at inducing the respiratory burst [18,19] and, according to those results, we may speculate that virulence evolved with the ability to avoid the triggering of the oxidative effector mechanisms of the macrophage. However, the role of oxygen radicals in the bacteriostasis and killing of *Mycobacterium avium* is still not yet clear. Whereas virulent strains are not restricted *in vitro* by activated macrophages through the production of reactive oxygen intermediates [17,20], less is known about SmOp strains. On the other hand, reactive nitrogen intermediates are not involved in bacteriostasis of either SmOp or SmTr strains [17].

To analyse in greater detail the role of TNF in resistance to mycobacterial infection with a mycobacteria known to be a good inducer of TNF secretion, we examined the role played by this cytokine in controlling the course of infection by *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra. Although considered avirulent compared with the H37Rv strain [10], we found here that H37Ra was able to proliferate during the first 2 weeks of infection in BALB/c mice. In contrast with the avirulent *Mycobacterium avium* strain, anti-TNF antibodies promoted H37Ra infection. Furthermore, the ability of the macrophage to produce TNF increased during the first 2 weeks of infection, probably under the influence of IFN- $\gamma$ . Thus when both cytokines were neutralized, the promotion of the infection was higher than when single cytokines were targeted. It is difficult to judge from our results whether the ability of H37Ra to trigger TNF early during the infection (before macrophage priming by the immune system) is associated with some innate control of the infection. We found that such priming for TNF secretion occurs when TNF was shown to be protective. On the other hand, *in vitro* neutralization of TNF led to some enhancement of bacterial growth, suggesting that TNF may act independently of the T cells and their cytokines (e.g. IFN- $\gamma$ ). *In vivo*, it is likely that TNF is acting mostly as one of the cytokines associated with the immune response rather than an early protective cytokine associated with the innate immunity to this *Mycobacterium tuberculosis* strain. The number of bacteria also influence the relative importance of the role played by TNF in resistance, namely in the spleen. When comparing the two experiments shown in Figs 4 and 5, it is apparent that a 20-fold reduction in the inoculum dose led to a smaller importance of TNF in resistance in the spleen. This may reflect the amount of triggering of the cytokine by a variable number of bacilli. These organ-related differences are also apparent in the lung, where single neutralization studies showed no significant differences. Thus, the importance of different cytokines may also depend on the organ that is

being considered. Finally, even in the absence of TNF, mice were able to exert some control of the infection, suggesting that other cytokines may compensate for the lack of the former cytokine.

In conclusion, we showed that TNF may, in some situations, mediate the control of infection by microbes that are potent agonists of its secretion. However, in other cases, loss of virulence, namely in *Mycobacterium avium*, is not associated with an increased ability to induce TNF secretion [16], but its basis must be sought at other levels, by looking either at other cytokines produced by the macrophages, or at the level of an increased sensitivity of the bacilli to the antimicrobial armamentarium of the non-activated macrophage.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica. The authors are indebted to Dr Paulo Vieira for supplying the hybridomas and to Jorge Pedrosa for skilful technical assistance.

#### REFERENCES

- Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 1993; 6:266-310.
- Meylan PR, Richman DD, Kornbluth RS. Characterization and growth in human macrophages of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from the blood of patients with acquired immunodeficiency syndrome. Infect Immun 1990; 58:2564-8.
- Pedrosa J, Flórido M, Kunze ZM *et al.* Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex isolates in mice. Clin Exp Immunol 1994; 98:210-6.
- Appelberg R, Sarmiento AM. The role of macrophage activation and of Bcg-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. Clin Exp Immunol 1990; 80:324-31.
- Stokes RW, Orme IM, Collins FM. Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. Infect Immun 1986; 54:811-9.
- Appelberg R, Pedrosa J. Induction and expression of protective T cells during *Mycobacterium avium* infections in mice. Clin Exp Immunol 1992; 87:379-85.
- Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J *et al.* The role of gamma interferon and tumor necrosis factor-alpha during the T cell independent and dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. Infect Immun 1994; 62:3962-71.
- Collins FM. *Mycobacterium avium* complex infections and development of the acquired immunodeficiency syndrome: casual opportunist or causal factor. Int J Leprosy 1986; 54:458-74.
- Collins FM. AIDS-related mycobacterial disease. Springer Semin Immunopathol 1988; 10:375-91.
- Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce C. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. J Exp Med 1947; 86:175-87.
- Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K *et al.* Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. Infect Immun 1992; 60:1249-53.
- Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol 1993; 150:1886-96.
- Barrow WW, Brennan PJ. Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. J Bacteriol 1982; 150:381-4.
- Barrow WW, Ullom BP, Brennan PJ. Peptidoglycolipid nature of the superficial wall sheath of smooth-colony-forming mycobacteria. J Bacteriol 1980; 144:814-22.
- Belisle JT, Brennan PJ. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. J Bacteriol 1989; 171:3465-70.
- Furney SK, Skinner PS, Roberts AD *et al.* Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor. Infect Immun 1992; 60:4410-3.
- Appelberg R, Orme IM. Effector mechanisms in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. Immunology 1993; 80:352-9.
- Gangadharam PRJ, Edwards CK. Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. Am Rev Respir Dis 1984; 130:834-8.
- Tomioka H, Saito H. Macrophage chemiluminescence induced by interaction with transparent and opaque colonial variants of *Mycobacterium intracellulare*. J Gen Microbiol 1993; 139:3011-5.
- Bermudez LEM, Young LS. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. Microb Pathogen 1989; 7:289-98.

**Artigo nº 3**

## Relationship between Virulence of *Mycobacterium avium* Strains and Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Infected Mice and in In Vitro-Cultured Mouse Macrophages

A. M. SARMENTO<sup>1\*</sup> AND R. APPELBERG<sup>1,2</sup>

Centro de Citologia Experimental<sup>1</sup> and "Abel Salazar" Biomedical Science Institute,<sup>2</sup>  
University of Porto, 4100 Porto, Portugal

Received 17 April 1995/Returned for modification 9 May 1995/Accepted 8 June 1995

We studied the ability of two *Mycobacterium avium* strains with different virulences to induce tumor necrosis factor alpha (TNF) synthesis by mouse resident peritoneal macrophages (RPM $\phi$ ) in vitro in an experiment to look for a possible correlation between virulence and this TNF-inducing capacity. The low-virulence strain, 1983, induced significantly higher production of TNF by RPM $\phi$  than did the high-virulence strain, ATCC 25291. TNF neutralization during culture of infected RPM $\phi$  resulted in enhancement of growth of strain 1983 and had no effect on growth of strain ATCC 25291; TNF treatment of strain ATCC 25291-infected macrophages had no effect on mycobacterial growth. The extent of *M. avium* growth and the amount of TNF synthesis were independent of the presence of contaminating T cells or NK cells in the macrophage monolayers. Intraperitoneal administration of anti-TNF monoclonal antibodies to BALB/c mice infected intravenously with *M. avium* 1983 abrogated the elimination of the bacteria in the liver and caused a slight increase in bacterial growth in the spleen. Neutralization of TNF led to a minor increase in the proliferation of *M. avium* ATCC 25291 in the liver and spleen of BALB/c mice late in infection. Anti-TNF treatment did not affect the growth of the two *M. avium* strains in BALB/c.Bcg<sup>r</sup> (C.D2) mice, suggesting that restriction of *M. avium* growth in these mycobacterium-resistant mice is TNF independent. In conclusion, the capacity of certain avirulent *M. avium* strains to induce TNF production by macrophages may limit their ability to proliferate both in vitro and in vivo.

*Mycobacterium avium* is a facultative intracellular pathogen of emerging importance in human disease, causing opportunistic infection in elderly individuals and in AIDS patients (29). These infections pose difficult problems for their management because of the resistance of *M. avium* to conventional antibiotics and antituberculous drugs.

Tumor necrosis factor alpha (TNF) is a cytokine that is produced mainly by macrophages/monocytes but is also secreted by other cells including B cells, T cells, NK cells, glial cells, and adipocytes (35). It affects the function of many cell types and is a mediator of inflammation and cellular immune responses (9, 22, 26, 34, 35).

TNF has been shown to play an important role in regulating the microbicidal activity of macrophages against several microorganisms (24, 32, 33), including *M. avium* (7, 13) and other mycobacteria (12, 22). In fact, TNF was reported to be involved in growth restriction of *M. avium*, both in vitro (7, 14, 17) and in vivo, during T-cell-independent and -dependent phases of *M. avium* infection (1, 3, 13). Induction of TNF production by mycobacteria has also been described (4, 11, 15, 17, 31). In fact, *M. leprae* induced TNF production in peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients (4), and lipoarabinomannan from *M. tuberculosis* induced TNF secretion by mouse casein-elicited peritoneal and bone marrow-derived macrophages (BMM $\phi$ ) (11). It was also reported that different strains of *M. avium* stimulated TNF production by mouse BMM $\phi$  (17) and human macrophages (15).

Different *M. avium* strains, living in different environments, may differ in virulence for mice (28). Furney et al. (17), working with two sets of *M. avium* strains, some able to proliferate

in in vitro-cultured macrophages and others unable to do so, showed that the nonvirulent strains induced earlier TNF production by BMM $\phi$  in vitro than did virulent strains. They also found that TNF addition to the infected macrophage cultures restricted the growth of the virulent strains of *M. avium*. These authors concluded that the capacity to induce early TNF production by macrophages may be relevant for determining the virulence of *M. avium* strains.

Another level of mouse innate resistance to mycobacteria depends on the expression of the *Bcg/Ity:Lsh* gene. This gene controls natural resistance or susceptibility of mice to infection by *M. bovis* BCG (19), *Salmonella typhimurium* (30), and *Leishmania donovani* (10). It also seems to play a role in resistance to *M. avium* infection (18), although evidence exists that other genes may also be involved (27). The *Bcg* gene is expressed by macrophages (20, 25). Earlier studies with *L. donovani* showed a differential expression of TNF by *Lsh*<sup>-</sup> and *Lsh*<sup>+</sup>-primed BMM $\phi$ ; the authors found a correlation between TNF production and leishmanicidal activity (8).

In previous work, we investigated whether the ability to trigger TNF secretion could account for the difference in virulence observed between two isogenic morphotype variants of *M. avium* 2-151 (smooth-transparent [SmTr] and smooth-opaque [SmOp]) (3). Although we could not show a relationship between virulence of these morphotypes and capacity to induce TNF secretion, we found that one avirulent *M. avium* strain (strain 1983) was able to induce high TNF secretion in vitro (whereas strain 2-151 SmOp and SmTr were not), and so avirulence of this strain could be related to its capacity to trigger the secretion of TNF. To test this hypothesis further, we used two *M. avium* strains differing in virulence for mice, strain ATCC 25291 (high virulence) and strain 1983 (low virulence), both with an SmTr morphotype, to infect mouse resident peritoneal macrophages (RPM $\phi$ ) from mycobacterium-susceptible

\* Corresponding author. Mailing address: Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 823, 4100 Porto, Portugal. Phone: 351-2-6099154. Fax: 351-2-6099157.

BALB/c mice. We studied TNF production *in vitro* by infected macrophages and the effects of recombinant TNF or anti-TNF antibody addition to RPM $\phi$  on *M. avium* intracellular growth. To find out about the existence of a relationship between natural resistance and TNF production in the *in vivo* infection, we studied the effect of anti-TNF treatment on the *in vivo* growth of *M. avium* ATCC 25291 or 1983 in mice naturally resistant (*Bcg*<sup>r</sup>) or susceptible (*Bcg*<sup>s</sup>) to *M. avium* infections.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** Female BALB/c mice, 8 to 12 weeks old, were purchased from the Instituto Gulbenkian de Ciéncia, Oeiras, Portugal. BALB/c *Bcg*<sup>r</sup> (C.D2) mice were bred at our facilities from parent mice generously donated by E. Skamene. Animals were kept under standard hygiene conditions, fed commercial chow, and given acidified drinking water *ad libitum*.

**Reagents.** Tween 80, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and saponin were purchased from Sigma, St. Louis, Mo. Middlebrook 7H9 and 7H10 media were obtained from Difco, Detroit, Mich. Hanks balanced salt solution, Dulbecco's modified Eagle's medium, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, and heat-inactivated fetal calf serum were purchased from Gibco, Paisley, United Kingdom. Recombinant mouse TNF was obtained from Genzyme, Cambridge, Mass. Lyophilized rabbit complement was purchased from Serotec, Oxford, England. All other reagents were purchased from Merck, Darmstadt, Germany.

**Hybridomas and antibodies.** The following hybridomas were used: 2.43, anti-Lyt 2.2 (ATCC TIB 210); GK 1.5, anti-L3T4 (ATCC TIB 207); PK 136, anti-NK 1.1; and MP6-XT22, monoclonal rat anti-mouse TNF (kindly donated by Paulo Vieira, DNAX Research Institute, Palo Alto, Calif.). All hybridomas were cultured until reaching exponential growth in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10 mM HEPES buffer and 10% fetal calf serum, and supernatants of 2.43, GK 1.5, and PK 136 were collected after culture centrifugation at 100  $\times$  g for 10 min. Anti-TNF was obtained from the ascites fluid of HSD nude mice, inoculated with the hybridoma MP6-XT22 from exponential growth culture, by protein G-agarose affinity chromatography. GL 113 anti- $\beta$ -galactosidase immunoglobulin G1 was kindly donated by P. Vieira and used as an isotype control. Fluorescein isothiocyanate-conjugated rat anti-mouse CD4 or CD8 and phycoerythrin-conjugated hamster anti-mouse CD3- $\epsilon$  monoclonal antibodies were purchased from Pharmingen, San Diego, Calif.

**Mycobacteria.** *M. avium* ATCC 25291 (high virulence for mice [28]) and 1983 (low virulence for mice [28]), both of the SmTr colony morphology, were grown in Middlebrook 7H9 medium containing 0.04% Tween 80 at 37°C until mid-log phase. The bacteria were harvested by centrifugation and resuspended in a small volume of saline containing 0.04% Tween 80. The suspension was briefly sonicated (15 s at 50 W) with a Branson sonifier to disrupt bacterial clumps, diluted, and frozen in aliquots at -70°C until use. The bacterial aliquots were thawed at 37°C and diluted to the desired concentration before being used for inoculation.

**Macrophage culture.** The peritoneal cells were collected from untreated BALB/c mice by washing the peritoneal cavity with Hanks balanced salt solution. The cells were centrifuged at 100  $\times$  g for 10 min, counted, and suspended at 3  $\times$  10<sup>6</sup> cells per ml in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10 mM HEPES buffer and 10% fetal calf serum. A 1-ml volume of the cell suspension was placed in each well of 24-well tissue culture plates, and the plates were incubated for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 7% CO<sub>2</sub>. Nonadherent cells were removed by washing with warm Hanks balanced salt solution, and the adherent cells were further incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium containing HEPES buffer and fetal calf serum.

In one experiment, the peritoneal exudate cells were incubated with culture supernatants of the hybridomas GK 1.5, 2.43, and PK 136 in the presence of complement for 45 min and then washed twice before being used for adhesion.

***In vitro* infection.** After removal of the nonadherent cells, the macrophage-enriched monolayers were inoculated with 10<sup>7</sup> CFU of *M. avium* ATCC 25291 or 1983 per well; the plates were centrifuged at 100  $\times$  g for 10 min and incubated for 2 h under the conditions described for macrophage adherence. For some wells, the supernatant was collected and TNF concentrations were immediately quantitated by the L929 bioassay. The extracellular bacteria were washed out, and the contents of a group of wells were then lysed with 0.1% saponin. Serial dilutions were seeded onto Middlebrook 7H10 medium with OADC supplement for CFU counts (time zero). The infected cells were maintained in culture for 7 days, and the same assays were performed after 3 and/or 7 days of infection. In some experiments, 5,000 neutralizing units of MP6-XT22 rabbit anti-mouse TNF or the same protein content of isotype control was added to the culture wells after removal of the nonphagocytosed bacteria. In other experiments, 500 U of recombinant mouse TNF per ml was added to the macrophage cultures each day.

**Bioassay for TNF determination.** TNF activity in culture supernatants from uninfected and infected RPM $\phi$  was determined by an L929 biological cytotoxicity assay (16). Briefly, 0.1 ml of L929 cell suspension (3  $\times$  10<sup>5</sup> cells per ml) was seeded per well of 96-well culture plates. After overnight incubation, 100- $\mu$ l portions of serial dilutions from culture supernatants from uninfected, strain 1983-infected, and strain ATCC 25291-infected RPM $\phi$  were added to the plates

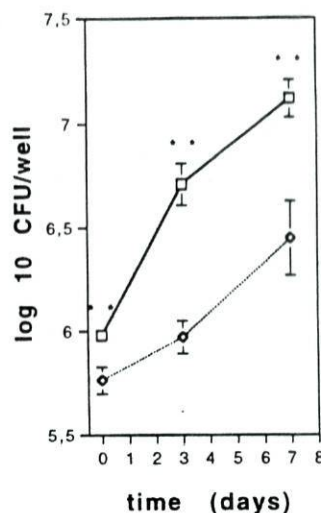


FIG. 1. Growth kinetics of *M. avium* ATCC 25291 (squares) and 1983 (diamonds) in RPM $\phi$  cultured *in vitro*. The results shown are from a typical experiment. \*\*,  $P < 0.010$ .

in the presence of 1  $\mu$ g of actinomycin D per ml. Cell viability was measured 24 h later by incubating the monolayers with MTT. One unit of TNF corresponds to the amount of TNF required to produce a 50% reduction in the amount of formazan produced.

**NK cell depletion and cytotoxicity assay.** Peritoneal exudate cells were treated or not treated with the supernatants of GK 1.5 (anti-L3T4), 2.43 (anti-Lyt 2.2) and PK 136 (anti-NK cell) in the presence of complement, and NK cell activity was determined in an aliquot of each cell suspension by measuring the cytotoxic activity of the peritoneal cells against target YAC-1 cells, as described elsewhere (23), and quantitating the release of <sup>51</sup>Cr from the target cells after coincubation (4 h) at different target/effecter cell ratios.

**T-cell depletion and fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis.** After treatment of peritoneal exudate cells with the supernatants of GK 1.5, 2.43, and PK 136 in the presence of complement, an aliquot of each cell suspension, treated and untreated, was stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated rat anti-mouse CD4 or CD8 and/or phycoerythrin-conjugated hamster anti-mouse CD3- $\epsilon$  monoclonal antibody. After being stained, cells were analyzed in a FAC-Scan apparatus (Becton-Dickinson). Among treated cells, the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells was less than 0.5% and the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells was less than 0.6%. The antibodies used for lysis were distinct from the ones used in the flow cytometric studies.

***In vivo* infection.** Mice were intravenously infected with 10<sup>6</sup> CFU of *M. avium* ATCC 25291 or 1983. At 5 h after the inoculation and every 15 days throughout the experiment, anti-TNF antibodies were administered by intraperitoneal injection to a group of mice infected with each *M. avium* strain at a dose of 2 mg of antibody per mouse. At days 30 and 60 after infection, the spleen and liver of the mice were collected and the number of CFU was determined by serial dilution and by plating the tissue homogenates onto 7H10 medium (Difco).

**Statistical analysis.** The Student *t* test was used to compare pairs of data.

## RESULTS

***In vitro* growth kinetics of *M. avium* ATCC 25291 and 1983 in mouse RPM $\phi$ .** The growth kinetics of the two *M. avium* strains in RPM $\phi$  are shown in Fig. 1. RPM $\phi$  monolayers were infected with either strain ATCC 25291 or strain 1983, and the growth of the bacteria inside the macrophages was studied for 7 days. Strain ATCC 25291 proliferated to a greater extent than did strain 1983 (5.39-fold at day 3, compared with 1.61-fold; 14.0-fold at day 7, compared with 5.13-fold), confirming our previous results on the characterization of the relative virulence of the two strains (28). Although the macrophage monolayers were infected with equal numbers of bacteria, strain ATCC 25291 was phagocytosed to a greater extent than was strain 1983.

**Pattern of *in vitro* TNF production during the infection period.** TNF activity present in the culture supernatants of uninfected or infected RPM $\phi$  was determined at several time

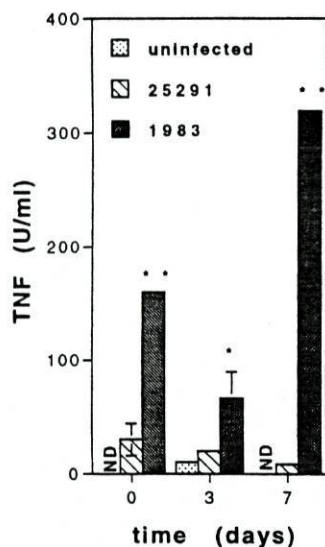


FIG. 2. TNF production by RPMφ infected in vitro with *M. avium* ATCC 25291 or 1983 or left uninfected. TNF activity was measured in the supernatants by the L929 bioassay. ND, not detected (the assay sensitivity is 10 U/ml). \*\*,  $P < 0.010$ ; \*,  $P < 0.050$ .

points (Fig. 2). Time zero activity was assessed immediately after the extracellular bacteria were washed out. Supernatants from *M. avium* 1983-infected RPMφ showed higher TNF activity than did supernatants from *M. avium* ATCC 25291-infected or uninfected RPMφ at all time points tested. Infection by strain 25291 led to a small but statistically significant increase in TNF secretion by RPMφ up to 3 days postinfection as compared with untreated macrophages.

**TNF production and *M. avium* growth in T-cell- and NK-cell-depleted RPMφ cultures.** To test the possible involvement of cytokines produced by T cells or NK cells that might be contaminating the macrophage cultures in the TNF production observed, we treated peritoneal cells, prior to adhesion, with anti-CD8, anti-CD4, and anti-NK cell antibodies in the presence of complement. The antibody treatment substantially decreased the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells present in the cell suspension as measured by FACS analysis (results not shown). NK-cell activity in the peritoneal cell suspension was undetectable either before or after the anti-NK-cell antibody treatment, as assayed by the YAC-1 cytotoxicity test (results not shown).

T-cell and NK-cell depletion of RPMφ cultures did not change TNF production at day 7 (Fig. 3A), suggesting the existence of a direct stimulation of macrophages for TNF production by the bacteria. *M. avium* growth was also not altered by T-cell and NK-cell depletion (Fig. 3B).

**TNF and anti-TNF treatment of RPMφ infected in vitro with *M. avium*.** When RPMφ were treated with 5,000 neutralizing units of anti-TNF antibodies, strain 1983 growth increased to a level similar to that of strain ATCC 25291 but the growth of strain ATCC 25291 was unaffected (Fig. 4). Because *M. avium* ATCC 25291 induced low TNF production by RPMφ, we treated ATCC 25291-infected RPMφ with 500 U of TNF per day to test whether we could reduce the growth of this virulent strain by supplying the cytokine exogenously. We found that TNF treatment of ATCC 25291-infected RPMφ did not interfere with bacillary growth (Fig. 5).

**Effects of anti-TNF treatment in vivo *M. avium* infection.** *M. avium* ATCC 25291 proliferated progressively in the organs of untreated BALB/c mice; after a small amount of growth

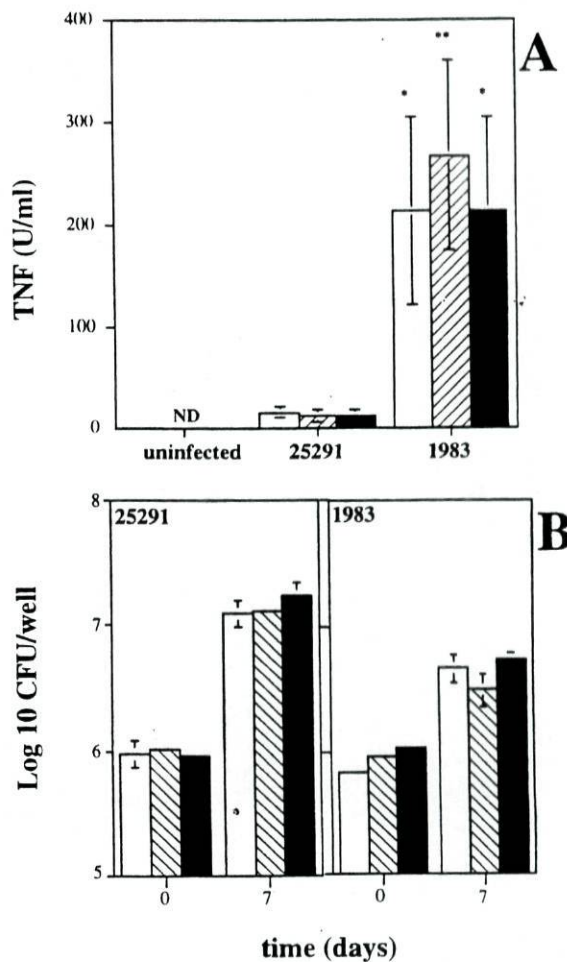


FIG. 3. Effects of T-cell depletion on in vitro TNF production by RPMφ at day 7 postinoculation (A) and *M. avium* growth in in vitro-cultured RPMφ (B). White columns, untreated adherent peritoneal exudate cells; hatched columns, peritoneal exudate cells treated with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies before adhesion, in the presence of complement; black columns, peritoneal exudate cells treated only with complement before adhesion. The results shown are from a typical experiment; each column represents the mean of three wells. ND, not detectable. \*\*,  $P < 0.010$ ; \*,  $P < 0.050$ .

observed until day 30 of infection in the liver and spleen, strain 1983 was slowly eliminated in the liver and its growth was arrested in the spleen. Both strains were slowly eliminated in the liver of untreated C.D2 mice, although strain 1983 was eliminated faster than strain ATCC 25291; strain ATCC 25291 was able to show a small amount of growth in the spleen of these mice, and strain 1983 was very slowly eliminated.

Neutralization of TNF in BALB/c mice infected with strain 1983 abrogated the clearance of the bacteria in the liver and caused a slight but significant increase in bacillary growth in the spleen at 30 and 60 days of infection. The same treatment in BALB/c mice infected with strain ATCC 25291 resulted in a minor, albeit significant, increase in mycobacterial growth only at 60 days of infection (Fig. 6). Such treatment in C.D2 mice had no effect on the growth of either strain 1983 or strain ATCC 25291 (Fig. 6).

## DISCUSSION

The data presented here extended the results reported by Furney et al. (17) and our own results (3) on the involvement



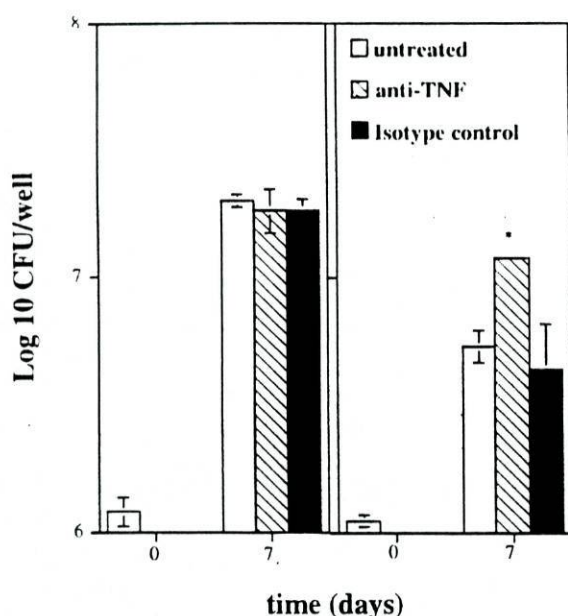


FIG. 4. Effect of anti-TNF treatment of in vitro-cultured RPM $\phi$  on the growth of *M. avium* ATCC 25291 (left panel) and 1983 (right panel). At day 0 of infection, 5,000 neutralizing units of anti-TNF was added to each well. These results are from a typical experiment. \*,  $P < 0.050$  compared with the isotype control.

of TNF in the early control of *M. avium* infection by mouse macrophages. We found that the induction of TNF secretion by macrophages in vitro by *M. avium* was higher with a strain of low virulence than with one of high virulence. This is in agreement with a general trend found among different mycobacteria correlating virulence with lack of induction of TNF (11, 15, 17). These authors used different macrophage populations such as BMM $\phi$ , casein-elicited peritoneal macrophages, and human macrophages. To focus on the relationships between the mycobacteria and the macrophages in the

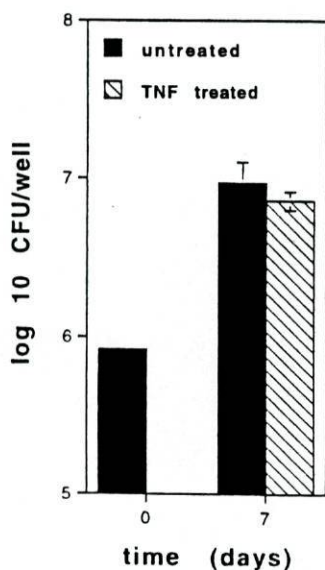


FIG. 5. Effect of TNF treatment of RPM $\phi$  on the growth of *M. avium* ATCC 25291. TNF treatment consisted of daily addition of 500 U of recombinant murine TNF per well throughout the experiment. The results represent a typical experiment.

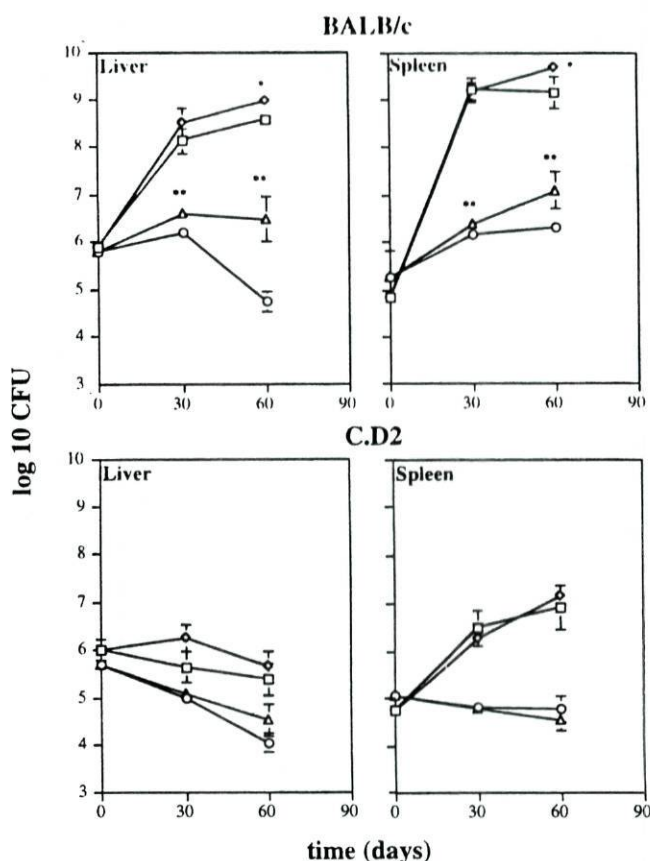


FIG. 6. Effect of anti-TNF treatment on the growth of *M. avium* ATCC 25291 or 1983 in vivo, in intravenously infected BALB/c (naturally susceptible) or C.D2 (naturally resistant) mice. Mice were given 2 mg of anti-TNF intraperitoneally at day 0 and every 2 weeks during infection. Squares, untreated mice infected with ATCC 25291; diamonds, anti-TNF-treated mice infected with ATCC 25291; circles, untreated mice infected with 1983; triangles, anti-TNF-treated mice infected with 1983. \*\*,  $P < 0.010$ ; \*,  $P < 0.050$ .

initial period of infection, we chose to study macrophages collected from the peritoneal cavity of untreated mice, since this macrophage population represents a resident macrophage population and is therefore the first population to make contact with the pathogen in vivo.

In our system, TNF production by macrophages was most probably not dependent on stimulation by other cytokines, such as gamma interferon, produced by small numbers of contaminating T cells or NK cells since depletion of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and NK1.1<sup>+</sup> cells did not affect TNF secretion. Although we cannot formally exclude that in vivo production of gamma interferon has not taken place in the peritoneal cavity of donor mice, it is rather unlikely that such a response had occurred in mice from our colony, which have never shown signs of natural infection. On the other hand, the results presented by Furney et al. (17) were obtained from BMM $\phi$ , in which no contamination by nonmacrophage cell types has been reported, but nevertheless, TNF triggering by *M. avium* was proven.

The studies mentioned above (11, 15, 17) have not evaluated the actual role of the TNF produced after infection of the macrophages. Indeed, the hypothesis that avirulent strains were not able to grow because of the early production of TNF was based only on the observation of an association between virulence and lack of TNF secretion. We tested this hypothesis with neutralizing antibodies both in vitro and in vivo. Neutralization of TNF during infection of RPM $\phi$  with strain 1983 in

in vitro enhanced the growth of this low-virulence strain to a level similar to that of strain ATCC 25291 but had no effect on the growth of the latter strain. Thus, by inducing the synthesis of TNF by RPM $\phi$ , strain 1983 was prevented from growing in the macrophages.

We also found that when TNF was exogenously added to the cultures, the growth of strain 25291 was not affected. This is in contrast to previous findings that showed that TNF alone induced bacteriostasis of *M. avium* ATCC 25291 in BMM $\phi$  (2). We suggest that RPM $\phi$  are less responsive to TNF than BMM $\phi$  or that other cytokines might be involved in the induction of bacteriostasis. Conversely, strain ATCC 25291 could be inducing the unresponsiveness to TNF in RPM $\phi$ . In this respect, it has been shown that a 33-kDa *M. avium* surface protein interferes with the regulation of transcription in macrophages, influencing the response of macrophages to stimulation with TNF (5, 21). Furthermore, interleukin-6 (6) was shown to down-regulate the expression of TNF receptors in the macrophage.

In vivo, TNF neutralization in BALB/c-mice infected with *M. avium* 1983 abrogated bacterial clearance in the liver and bacteriostasis in the spleen, suggesting the existence of a TNF-dependent antimycobacterial activity against strain 1983 in those organs. Neutralization of TNF in BALB/c mice infected with the highly virulent strain showed minor effects on its growth, which were observed later in infection when macrophage priming for TNF secretion is expected to have occurred (1). These data suggest that the early induction of macrophage TNF production by strain 1983 in vivo may be relevant in restraining the growth of this strain, when T-cell-dependent immunity is not yet established. However, TNF is probably not the only factor responsible for the low proliferation of strain 1983 in vivo, because this strain grew poorly compared with strain ATCC 25291 even in TNF-depleted mice.

The innate ability of C.D2 mice to restrict the growth of *M. avium* was independent of TNF, since the neutralization of this cytokine did not significantly affect the growth of both *M. avium* strains in these mice. This is in contrast to what has been postulated as the basis of the resistance to *Leishmania major* infection in *Bcg*<sup>r</sup> (*Lsh*<sup>r</sup>) animals reported by Blackwell et al. (8); in their model, BMM $\phi$  from *Lsh*<sup>r</sup> mouse strains released larger amounts of TNF in response to lipopolysaccharide and gamma interferon than did BMM $\phi$  from *Lsh*<sup>s</sup> mouse strains, correlating with higher leishmanicidal activity of *Lsh*<sup>r</sup> macrophages. We suggest that the *Bcg* gene may essentially affect the antimycobacterial mechanisms of macrophages or their response to the cytokines rather than the autocrine regulation of the function of macrophages through cytokine release.

In conclusion, induction of TNF production by a low-virulence strain of *M. avium* (strain 1983) in resident macrophages seems to be relevant to the limiting of bacterial growth in vitro. In vivo, the capacity of strain 1983 to induce TNF production might be relevant for growth restriction of this strain, prior to the establishment of the T-cell response. On the other hand, a highly virulent strain (ATCC 25291) induces little, if any, TNF production in resident macrophages and TNF seems to play a role in growth restriction in vivo only after a T-cell response is established: either high doses of TNF are required and stimulate primed macrophages, or synergism with T-cell cytokines, like gamma interferon, is needed for TNF to be effective in limiting the growth of *M. avium* ATCC 25291. The relationship between avirulence and a TNF-dependent innate mechanism of resistance should not, however, be generalized to all isolates of *M. avium*. Susceptibility of different isolates of *M. avium* to the TNF-induced macrophage antimycobacterial mechanisms was previously shown to vary (2). Most importantly, other

avirulent strains of *M. avium* have been shown to be eliminated by TNF-independent mechanisms (3). More extensive studies involving larger numbers of isolates are surely warranted.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica.

We are indebted to Paulo Vieira for supplying the hybridomas, to António G. Castro for performing FACS analysis, and to M. T. Silva for helpful discussions.

#### REFERENCES

- Appelberg, R., A. G. Castro, J. Pedrosa, R. A. Silva, I. M. Orme, and P. Minóprio. 1994. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* 62:3962-3971.
- Appelberg, R., and I. M. Orme. 1993. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology* 80:352-359.
- Appelberg, R., A. Sarmento and A. G. Castro. 1995. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence. *Clin. Exp. Immunol.* 101:308-313.
- Barnes, P. F., D. Chatterjee, P. J. Brennan, T. H. Rea, and R. L. Modlin. 1992. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 60:1441-1446.
- Bermudez, L. E., J. Claesgens, L. S. Young, and M. Wu. 1991. 33kDa protein from *Mycobacterium avium* complex binds to macrophage DNA and interferes with cytokine-mediated stimulation. *abstr. U-48*, p. 150. *In Abstracts of the 91st General Meeting of the American Society for Microbiology* 1991. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Bermudez, L. E., M. Wu, M. Petrofsky, and L. S. Young. 1992. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect. Immun.* 60:4245-4252.
- Bermudez, L. E. M., and L. S. Young. 1988. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- $\gamma$ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J. Immunol.* 140:3006-3013.
- Blackwell, J. M., T. I. A. Roach, S. E. Atkinson, J. W. Ajioka, C. H. Barton, and M.-A. Shaw. 1991. Genetic regulation of macrophage priming/activation: the *Lsh* gene story. *Immunol. Lett.* 30:241-248.
- Bonta, I. L., S. Ben-Efraim, T. Mózes, and M. W. J. A. Fieren. 1991. Tumor necrosis factor in inflammation: relation to other mediators and to macrophage antitumor defence. *Pharmacol. Res.* 24:115-130.
- Bradley, D. J., B. A. Taylor, J. M. Blackwell, E. P. Evans, and J. Freeman. 1979. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 37:7-14.
- Chatterjee, D., A. D. Roberts, K. Lowell, P. J. Brennan, and I. M. Orme. 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 60:1249-1253.
- Denis, M. 1991. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *J. Leukocyte Biol.* 50:495-501.
- Denis, M. 1991. Modulation of *Mycobacterium avium* growth in vivo by cytokines: involvement of tumor necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. *Clin. Exp. Immunol.* 83:466-471.
- Denis, M., and E. O. Gregg. 1990. Recombinant tumor necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* 71:139-141.
- Fattorini, L., Y. Xiao, B. Li, C. Santoro, F. Ippoliti, and G. Orefici. 1994. Induction of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and G-CSF in human macrophages by smooth transparent and smooth opaque variants of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.* 40:129-133.
- Flick, D. A., and G. E. Gifford. 1984. Comparison of *in vitro* cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 68:167-176.
- Furney, S. K., P. S. Skinner, A. D. Roberts, R. Appelberg, and I. M. Orme. 1992. Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 60:4410-4413.
- Goto, Y., R. M. Nakamura, H. Takahashi, and T. Tokunaga. 1984. Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Infect. Immun.* 46:135-140.
- Gros, P., E. S. Skamene, and A. Forget. 1981. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J. Immunol.* 127:2417-2422.
- Gros, P., E. Skamene, and A. Forget. 1983. Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Immunol.* 131:1966-1972.
- Inderlied, C. B., C. A. Kemper, and L. E. Bermudez. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:266-310.
- Kindler, V., A.-P. Sappino, G. E. Grau, P.-F. Piquet, and P. Vassalli. 1989.

- The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**:731-740.
23. Koo, G. C., F. J. Dumont, M. Tutt, J. Hackett, Jr., and V. Kumar. 1980. The NK-1.1(-) mouse: a model to study differentiation of murine NK cells. *J. Immunol.* **137**:3742-3747.
  24. Langermans, J. A. M., M. E. B. Van der Hulst, P. H. Nibbering, P. S. Hiemstra, L. Franssen, and R. van Furth. 1992. IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **148**:568-574.
  25. O'Brien, A. D., I. Sher, and S. B. Formal. 1979. Effect of silica on the innate resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* **25**:513-520.
  26. Ohmori, Y., L. Wyner, S. Narumi, D. Armstrong, M. Stoler, and T. A. Hamilton. 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **142**:861-870.
  27. Orme, I. M., R. W. Stokes, and F. M. Collins. 1986. Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. *Infect. Immun.* **54**:56-62.
  28. Pedrosa, J., M. Flórido, Z. M. Kunze, A. G. Castro, F. Portaels, J. J. McFadden, M. T. Silva, and R. Appelberg. 1994. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex isolates in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **98**:210-216.
  29. Pitchenik, A. E., and D. Fertel. 1992. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease. *Med. Clin. North Am.* **76**:121-171.
  30. Plant, J. E., and A. A. Glynn. 1976. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Infect. Dis.* **133**:72-78.
  31. Pourshafie, M., Q. Ayub, and W. W. Barrow. 1993. Comparative effects of *Mycobacterium avium* glycopeptidolipid and lipopeptide fragment on the function and ultrastructure of mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:72-79.
  32. Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lötscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Köntgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature (London)* **364**:798-802.
  33. Tite, J. P., G. Dougan, and S. N. Chatfield. 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J. Immunol.* **147**:3161-3164.
  34. Tracey, K. J., and A. Cerami. 1992. Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**:233-239.
  35. Tracey, K. J., and A. Cerami. 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:317-343.

## **Artigo nº 4**

Involvement of reactive oxygen intermediates in the  
tumor necrosis factor (TNF) alpha-dependent  
bacteriostasis of *Mycobacterium avium*

Amélia Sarmiento and Rui Appelberg

Centro de Citologia Experimental, University of Porto, Portugal

Correspondence:

Rui Appelberg, Centro de Citologia Experimental,

Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal,

Telephone #(351).2.6099154, FAX #(351).2.6099157

Keywords: Mycobacteria, macrophage, microbicidal activity, virulence.

Running title: Bacteriostasis of *Mycobacterium avium*.

Infection and Immunity, Aug. 1996, Vol. 64, No. 8, in press.

## ABSTRACT

Here we studied the involvement of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates in the bacteriostasis of two *M. avium* strains differing in virulence by resident peritoneal macrophages. We found that both the highly virulent (strain 25291) and the low virulence (strain 1983) *M. avium* induced superoxide production but inhibited nitrite production by *in vitro*. This inhibition was due to the production of superoxide, a nitric oxide scavenger. The stimulation of superoxide production was 2-5-fold higher in strain 1983-infected as compared to strain 25291-infected resident peritoneal macrophages and was independent of contaminating T cells or NK cells. Superoxide secretion was dependent on the tumor necrosis factor (TNF) produced endogenously by the macrophages. This was also true when macrophages were isolated from infected mice. Addition of TNF to the infected resident peritoneal macrophages caused only a slight, albeit significant, increase in superoxide production by strain 25291-infected macrophages. Incubation of resident peritoneal macrophages with different scavengers of reactive oxygen intermediates showed that strain 1983 was susceptible to hydrogen peroxide produced by resident peritoneal macrophages. Strain 25291 was shown to decrease superoxide secretion inside heavily infected bone marrow-derived macrophages. This strain was also shown to be a better trigger for reactive oxygen intermediates production than strain 1983. In summary, strain 1983 induced high TNF synthesis that acted in an autocrine fashion to stimulate reactive oxygen intermediates production by macrophages leading to growth restriction mediated by hydrogen peroxide. The highly virulent strain 25291 induced low TNF synthesis and, therefore, low reactive oxygen intermediate production and, in addition, could also inhibit superoxide production by the infected macrophages.

## INTRODUCTION

*Mycobacterium avium* bacilli grow intracellularly inside macrophage phagosomes [20], circumventing the antimicrobial mechanisms of this phagocyte. However, macrophages can be activated to increase their microbiostatic/microbicidal capacity against *M. avium*. This activation may occur by T cell-dependent [2, 28, 46, 47] as well as, possibly, by T cell-independent mechanisms, such as those involving NK cells [5, 18, 27, 42] or direct macrophage activation by microbial products [11, 26, 30, 41, 53]. Among other mechanisms, there are two metabolic pathways involved in the microbicidal activity of macrophages: production of reactive oxygen intermediates (ROI) and of reactive nitrogen intermediates (RNI). ROI are microbicidal against several different microorganisms [25, 34-39, 44, 48]. Their role in antimycobacterial activity of mononuclear phagocytes is still not completely understood. Thus, *M. microti* was shown to be susceptible to hydrogen peroxide produced by activated macrophages [52] but ROI were found not to be involved in growth restriction of *M. bovis* and *M. tuberculosis* inside macrophages [13, 19]. We have found that IFN- $\gamma$ -induced growth restriction of virulent *M. avium* in bone marrow-derived macrophages was not dependent on ROI generation [3]. However, low virulence strains of *M. avium* and *M. intracellulare* seem to trigger higher superoxide production by macrophages than highly virulent strains, suggesting that ROI may act to restrict the growth of low virulence strains [21, 49]. A similar association between virulence and susceptibility to macrophage-derived ROI was found by Bermudez and Young [9].

In mouse macrophages, RNI play an essential role in the microbicidal activity against various microorganisms such as the protozoa *Leishmania* [24, 32], *Toxoplasma* [1, 31], *Trypanosoma* [22, 50, 51] and *Plasmodium* [40], the bacterium *Listeria monocytogenes* [6, 7, 10], and the fungi *Cryptococcus* [23] and *Candida* [12]. RNI also seem to be involved in the IFN- $\gamma$ -induced growth restriction of *M. tuberculosis* in macrophages [13]. However, conflicting data were reported in the literature concerning *M. avium* susceptibility against

RNI. Both our group [3] and that of Bermudez [7] showed that inhibition of nitric oxide synthesis had no effect on *M. avium* growth in activated human or murine macrophages. In a study comprising 72 strains of *M. avium*, Sato et al. reported that most of those strains were resistant to sodium nitrite *in vitro* [45]. On the other hand, some *M. avium* strains were found to be susceptible to RNI [14, 17].

In a previous work, we studied two *M. avium* strains, differing in virulence for mice, in their ability to induce TNF secretion by resident peritoneal macrophages cultured *in vitro*. We found that the low virulence strain (strain 1983) could induce secretion of higher levels of TNF as compared to the highly virulent strain (strain ATCC 25291) and that neutralization of TNF, both *in vitro* and *in vivo*, led to enhanced growth of *M. avium* strain 1983 [43]. To further extend these results, we studied the involvement of ROI and RNI in *M. avium* growth inside resident peritoneal macrophages, and the role of these intermediates in the TNF-dependent bacteriostatic activity of resident peritoneal macrophages against 1983, *in vitro*. We also studied the importance of the interaction of ROI and RNI metabolic pathways in the control of *M. avium* intracellular growth.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice:** Female BALB/c (*M. avium* -susceptible) mice were purchased from the Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras, Portugal) and used at 8-12 weeks of age. Animals were kept under standard hygiene conditions, fed commercial chow and given acidified drinking water *ad libitum*.

**Reagents:** Tween 80, saponin, phorbol myristate acetate (PMA), cytochrome c, nitroblue tetrazolium (NBT), latex beads (1.09  $\mu\text{m}$ ), Percoll, N-(1-naphthyl)-ethylene-diamino dihydrochloride, and sulfanilamide were purchased from Sigma (St.Louis, MO). Middlebrook 7H9 and 7H10 media were obtained from DIFCO (Detroit, MI). Hank's Balanced Salt Solution



(HBSS), Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), HEPES buffer and heat inactivated Foetal Calf Serum (FCS), were purchased from GIBCO (Paisley, U.K.). Recombinant mouse (rm) TNF- $\alpha$  was obtained from GENZYME (Cambridge, MA). Lyophilized rabbit complement was purchased from SEROTEC (Oxford, England). N-monomethyl L-arginine (NMMA) was from Chem Biochem Research (Salt Lake City, UT). All other reagents were purchased from MERCK (Darmstadt, Germany).

**Hybridomas and antibodies:** The following hybridomas were used: 2.43, rat anti-Lyt 2.2/CD8 (ATCC TIB 210); GK 1.5, rat anti-L3T4/CD4 (ATCC TIB 207); MP6-XT22, monoclonal rat anti-mouse TNF- $\alpha$  (kindly provided by Paulo Vieira, DNAX Research Institute). All hybridomas were cultured in DMEM containing 10 mM HEPES buffer and 10% FCS, until exponential growth, and supernatants of 2.43 and GK 1.5 were collected after culture centrifugation at 100xg for 10 min. Anti-TNF antibody was obtained from the ascitic fluid of HSD nude mice inoculated with the hybridoma MP6-XT22, following protein G-agarose affinity chromatography. GL 113 anti- $\beta$ -galactosidase IgG1 was kindly provided by P. Vieira (DNAX Research Institute) and used as an isotype control.

**Mycobacteria:** *Mycobacterium avium* ATCC 25291 (highly virulent for mice) and 1983 (with low virulence for mice), were grown in Middlebrook 7H9 broth containing 0.04% of Tween 80 at 37°C until mid-log phase. The bacteria were collected by centrifugation and resuspended in a small volume of saline containing 0.04% Tween 80. The suspension was briefly sonicated (15 sec, at 50 W) with a Branson sonifier to disrupt bacterial clumps, diluted and frozen in aliquots at -70°C until use. They were thawed at 37°C and diluted to the desired concentration before inoculation.

**Resident peritoneal macrophage culture:** The peritoneal exudate was collected from untreated BALB/c mice by washing the peritoneal cavity with 5ml of HBSS. The cells

were centrifuged at 100xg for 10 min, counted and suspended at the concentration  $3 \times 10^6$  cell/ml in DMEM containing 10 mM HEPES buffer and 10% FCS. One ml of the cell suspension was placed in each well of 24-well tissue culture plates and the plates were incubated for 2 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 7% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed by washing with warm HBSS and the adherent cells were further incubated in DMEM.

In one experiment, the peritoneal exudate cells were depleted of T cells. For that purpose,  $50 \times 10^6$  peritoneal cells were incubated with 10 ml of culture supernatants of the hybridomas GK 1.5 and 2.43 (1:1), in the presence of rabbit complement (1:30 dilution) for 45 min., followed by two washes, before adhesion.

**Bone marrow-derived macrophage culture:** Bone marrow macrophages were obtained by culturing bone marrow cells for 10 days with L929 cell line-conditioned medium as previously described [3]. The monolayers were inoculated as described below.

***In vitro* infection:** After removal of the non-adherent cells, the macrophage-enriched monolayers were inoculated with  $1 \times 10^7$  CFU/well of *M. avium* 25291, or *M. avium* 1983; in one experiment, some wells were incubated with  $2 \times 10^6$  or  $2 \times 10^7$  CFU of *M. avium* 25291/well. In another experiment, at the time of inoculation, macrophage cultures were incubated with each of several scavengers of ROI: catalase (0.01 or 0.1 mg/ml), superoxide dismutase (150 or 1500 U/ml), histidine (0.3 or 3 mg/ml) and mannitol (1 or 10 mg/ml). The plates were centrifuged at 100xg for 10 min, and incubated for 2 hours in the conditions described for macrophage adherence. The extracellular bacteria were washed out and O<sub>2</sub><sup>-</sup> or NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production was immediately assessed (time 0); in some experiments, cells were lysed at time 0 with 0.1% saponin and serial dilutions were seeded onto Middlebrook 7H10 agar medium with OADC supplement for CFU counts. The infected cells were maintained in culture for 7 days and the same assays were performed at 3 and/or 7 days. In

one experiment, 5000 Neutralizing Units (NU) of MP6-XT22 rat anti-mouse TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, or the same protein content of isotype control monoclonal antibody, were added to a group of culture wells after removal of the non-phagocytosed bacteria. In another experiment, 500 U/ml of recombinant mouse TNF- $\alpha$  were added daily to the macrophage cultures.

***In vivo* infection:** Mice were intraperitoneally (i.p.) infected with  $2 \times 10^8$  CFU of *M. avium* 25291 or 1983, or injected with inoculum vehicle (saline with 0.04% tween 80). Three hours after the infection, groups of mice were intravenously (i.v.) injected with 2 mg of MP6-XT22 anti-TNF monoclonal antibody. At day 7 after infection the peritoneal exudate was collected and centrifuged over 55% isotonic Percoll. The cells in the interface (mononuclear cells) were collected, counted, resuspended in DMEM and plated in a 24-well tissue culture plate at a concentration of  $3 \times 10^6$  cells/well. After a 2 hours incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 7% of CO<sub>2</sub>, non-adherent cells were washed out and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was assayed immediately.

**Assay of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production:** The O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was assessed by the O<sub>2</sub><sup>-</sup>-dependent reduction of ferricytochrome c, as described [29]. After the reaction time (90 minutes), the supernatants were collected and spectrophotometric measurements were made. The protein content of the cell monolayers was determined by the method of Lowry et al. [33], and results were expressed as nmol of O<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg protein/90 min. In most assays PMA was added as a triggering agent in the reaction mixture, at a concentration of 0.81  $\mu$ M. In a few experiments, *M. avium* bacilli were used as the triggering stimulus at the doses indicated in the figure legends.

**Assay of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production:** Aliquots of the supernatants of the macrophage cultures, infected or not with *M. avium*, were collected and the amount of nitrite present in

these supernatants was quantified by a colorimetric assay using the Griess reagent as described elsewhere [16].

**NBT reduction:** In some experiments, macrophage adhesion was performed over glass coverslips for NBT reduction assays. At the infection times studied, cells were incubated with a 0.2% solution of NBT in PBS for 30 min. After this time the coverslips in each well were removed and washed in warm PBS. The cells were then fixed in a mixture of formol-ethanol 1:1, stained for acid fast bacilli and counterstained in a 2% solution of malaquite green. The coverslip was attached to a slide with Entellan (Merck) and the percentage of formazan-positive (superoxide-producing) and formazan-negative (superoxide nonproducing) cells was determined.

**Statistical analysis:** The student *t* test was used to compare pairs of data.

## RESULTS

**Superoxide and nitrite production during resident peritoneal macrophage infection with *M. avium* strain 25291 or strain 1983:** Resident peritoneal macrophages were infected *in vitro* with *M. avium* strain 25291 or strain 1983, as described in Materials and Methods, or left uninfected. At time 0 (immediately after washing off the extracellular bacteria), day 3 and day 7 after infection (or culture), the amounts of superoxide (Fig.1A) and nitrite (Fig.1B) produced were evaluated. Results were compared to the values obtained with uninfected cells. *M. avium*-infected macrophages produced significantly higher amounts of PMA-triggered superoxide than uninfected macrophages at 3 and 7 days after infection and the highest values were obtained for strain 1983-infected macrophages, at 7 days after infection (Fig.1A). In contrast, *M. avium*-infected resident peritoneal macrophages

produced lower levels of nitrite than uninfected macrophages at all times studied (Fig. 1B). No significant differences were found between strain 25291- and strain 1983-infected macrophages as regards nitrite secretion. The addition of 1500 U of SOD to macrophages infected with either of the two strains led to a 6 to 8-fold increase in nitrite levels (not shown) showing that superoxide was scavenging nitric oxide. The enhancement in nitrite secretion was abrogated by NMMA showing that it was being produced through the nitric oxide synthase pathway (not shown).

**Effect of T cell depletion on superoxide production by resident peritoneal macrophages *in vitro*:** To test whether T cells present in the macrophage monolayer could be involved in the stimulation of superoxide production observed in infected resident peritoneal macrophages, the peritoneal cells were treated, prior to adhesion, with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies in the presence of complement. This treatment eliminated the T cell population, as determined by FACS analysis (results not shown). Superoxide production was assayed at day 7 after 25291 or 1983 infection in macrophages left untreated, treated with the antibodies and complement, and treated with complement alone. No differences were observed between the different treatments (not shown). Furthermore, no NK cell activity could be detected in the peritoneal washouts as determined by a YAC-1 cytotoxicity assay (not shown) suggesting that NK cell-mediated macrophage activation was not occurring. Previous experiments using NK cell-depleting antibodies have shown no differences in the macrophage activation induced by the infection with these two *M. avium* strains [43].

**Effect of anti-TNF antibody or rmTNF addition on superoxide production by resident peritoneal macrophages:** We tested whether TNF produced by macrophages in culture was responsible for the observed stimulation of superoxide production. Both uninfected and *M. avium*-infected macrophage cultures were exposed to the

MP6-XT22 anti-TNF monoclonal antibody or an isotype control, immediately after washing the extracellular mycobacteria and throughout the infection period. Anti-TNF significantly inhibited superoxide production by 25291- and 1983-infected macrophages at day 7 after infection, as compared to the isotype control monoclonal antibody-treated infected macrophages (Fig. 2A). This was most marked in the macrophage cultures infected with strain 1983 which showed the highest superoxide secretion in the control cultures and a reduction to levels comparable to those found in strain 25291-infected macrophages following TNF neutralization.

To extend the results described above, we assessed the effect of adding 50 or 500 U/day of rmTNF on superoxide production by resident peritoneal macrophages cultures infected or not with *M. avium*. TNF treatment significantly increased superoxide production by uninfected macrophages in a dose-dependent way (Fig. 2B). However, addition of 500 U/day caused only a slight, although significant, increase in 25291-infected macrophages, and neither dose of TNF added showed any effect on 1983-infected macrophages (Fig. 2B).

**Superoxide production by peritoneal macrophages isolated from *M. avium*-infected mice treated or not with anti-TNF:** We studied superoxide production by peritoneal macrophages isolated from *M. avium*-infected mice, or mice injected with the inoculum vehicle, at day 7 after i.p. inoculation. The MP6-XT22 anti-TNF monoclonal antibody was injected i.v. 3 hours after i.p. infection to a group of mice (2 mg/mouse). Although there were no differences observed in superoxide production between macrophages from 25291- and 1983-infected mice, macrophages from anti-TNF-treated mice showed decreased superoxide production as compared to macrophages from untreated, infected mice (Fig. 3).

**Effects of ROI scavengers on *M. avium* growth in resident peritoneal macrophages *in vitro*:** The results presented here as well as those already published [43]

show that strain 1983 induces a higher secretion of TNF- $\alpha$  responsible for a higher secretion of ROI in infected macrophages as compared to strain 25291, leading to the restriction of growth of strain 1983. It was also shown that TNF neutralization promoted the proliferation of strain 1983 in *in vitro* cultured macrophages and *in vivo* in BALB/c mice [43]. These data prompted us to assess the role of ROI in growth restriction of strain 1983 in this pathway of autocrine/paracrine macrophage activation. We thus studied the effect of the addition of catalase or SOD (scavengers of hydrogen peroxide and superoxide anion, respectively), histidine or mannitol (scavengers of the hydroxyl radical) on the growth of *M. avium* 25291 and 1983 inside resident peritoneal macrophages. All scavengers were added to the macrophage cultures at the same time as the infecting mycobacteria, so that they could be internalized with the bacilli. Catalase caused a statistically significant increase in the growth of strain 1983 (Fig.4). Boiled catalase did not show this effect (results not shown). Neither SOD nor mannitol addition affected bacterial growth and histidine had only a slight bacteriostatic effect at 3mg/ml. None of the scavengers used affected the growth of strain 25291 (not shown).

**Triggering ability of both *M. avium* strains for superoxide production by resident peritoneal macrophages:** The resistance of *M. avium* 25291 to ROI could depend on its inability to trigger superoxide secretion rather than or in addition to its deficient priming activity on ROI metabolism of infected macrophages. To study the capacity of strains 1983 and 25291 to trigger a respiratory burst response on the macrophages, resident peritoneal macrophages were infected or not with either *M. avium* strain and cultured for 7 days. At this timepoint, the mycobacteria were added to the culture wells to trigger the oxidative response. As shown in table 1, when strain 1983 was used as a trigger for macrophages infected with *M. avium* 1983 there was a higher secretion of superoxide than when strain 25291 was used as a trigger for macrophages infected with *M. avium* 25291 ( $P < 0.05$  at the two inoculum doses tested). However, when the priming for ROI secretion

was the same for both triggers (2 days with 500 U/ml of rmTNF) strain 25291 was shown to be a better trigger than strain 1983 (Fig. 5).

**Growth of *M. avium* 25291 on superoxide producing and nonproducing bone marrow-derived macrophages:** In addition to being a poor inducer of TNF and, therefore, leading to a minimal priming for ROI secretion, strain 25291 appeared to make macrophages insensitive to TNF-mediated priming for superoxide release (Fig. 2B). To test whether infection by *M. avium* 25291 affected the superoxide-producing capacity of the macrophages, we incubated strain 25291-infected bone marrow-derived macrophages with an NBT solution at time 0, 3 and 7 days after infection, and counted the number of acid-fast bacilli in formazan-positive (superoxide-producing) and formazan-negative (superoxide-nonproducing) macrophages (Fig. 6). We found that, at day 7 after infection, the macrophages containing higher numbers of 25291 were formazan-negative. To extend these latter results, we inoculated *in vitro*-cultured bone marrow-derived macrophages with strain 25291 at 3 different inoculum concentrations for 24 hours, to test which effects had increasing numbers of inoculated bacteria on the capacity of infected macrophages to produce superoxide anion (Table 2). There was a dose-dependent decrease in the percentage of formazan-positive cells, which suggested an inhibition of macrophage superoxide production by high numbers of 25291 bacilli.



## DISCUSSION

In a previous work we found that a low virulence strain of *M. avium* (strain 1983) stimulated TNF production by resident peritoneal macrophages cultured *in vitro* which, in an autocrine way, increased the bacteriostatic capacity of these cells for that *M. avium* strain [43]. That was not found with another strain of *M. avium* with high virulence for mice. Although RNI and ROI are known to participate in the growth restriction of several microorganisms, little is known about their involvement in the bacteriostasis of macrophages against low virulence *M. avium* strains. For this reason and since TNF- $\alpha$  is involved in the priming of both ROI and RNI production, we investigated here whether these effector mechanisms of the macrophages participated in the TNF-dependent bacteriostasis against strain 1983 *in vitro* and compared the results obtained with that strain with the ones obtained with the highly virulent strain 25291, to analyse the basis of the virulence of this latter strain.

Both *M. avium* strains were found to prime for ROI secretion by macrophages in the absence of T cells and NK cells, or their products. Strain 1983 stimulated the production of 2 to 5-fold more superoxide anion than strain 25291, depending on the experiments. On the contrary, neither strain stimulated nitrite production; in fact, infected macrophages showed a decrease in nitrite secretion as compared to uninfected macrophages. The increase of nitrite production observed with the addition of SOD to the macrophage cultures showed that the superoxide produced by the *M. avium*-infected cells was acting as a scavenger of nitric oxide. These results as well as previous ones [3] led us not to test further the role of RNI.

The TNF synthesis induced by strain 1983 in macrophages [43], was found here to prime for superoxide production in an autocrine/paracrine way. On the other hand, strain 25291, a poor inducer of TNF synthesis by macrophages [43] induced low levels of priming for superoxide secretion. We therefore showed the existence of a TNF-dependent mechanism for the priming of macrophages for superoxide production. This mechanism was also observed *ex vivo*, in peritoneal macrophages of BALB/c mice infected i.p. with either one of

the mycobacterial strains. In this situation, we did not find any significant difference in macrophage superoxide production between strain 25291- and strain 1983-infected mice, probably because other factors, e.g. serum factors and NK cell products, are present and may regulate ROI production *in vivo* .

TNF addition to strain 1983-infected resident peritoneal macrophage cultures did not further stimulate superoxide production, probably because these cells were already fully activated and could not respond to further stimuli. Although strain 25291 is not a good priming agent for TNF secretion by resident peritoneal macrophages [43], strain 25291-infected macrophages were also low responders to exogenously added TNF with respect to stimulation of superoxide production. In addition, we were unable to detect superoxide production inside macrophages heavily infected with strain 25291 using the NBT assay. Thus, it is likely that the virulent strain may down regulate the capacity of these phagocytes to synthesize ROI, or that the high numbers of this bacilli found inside them may be eliminating the superoxide being produced. We have reported augmented ROI production by peritoneal macrophages of BALB/c mice infected with strain 25291 at day 30 of infection [4]. In this situation, the mycobacteria were proliferating extensively despite such ability of the macrophages to produce ROI. This apparent contradiction may be explained by the results presented here that show that even when there is an overall priming of the macrophage population, the bacilli could be inhibiting the ROI produced in the infected peritoneal macrophages themselves, a minority among the macrophages recruited to the infectious foci. Synthesis of other mediators (e.g. IL-6) by strain 25291-infected macrophages could decrease expression of membrane TNF receptors and hence render these phagocytes low responders to TNF stimulation [8, 15].

The association of the induction of TNF secretion with both the induction of bacteriostasis and the priming for ROI release led us to test directly the possible role of ROI in bacteriostasis. Addition of catalase to *M. avium* 1983-infected macrophages showed that this strain was susceptible to hydrogen peroxide produced by the phagocyte. The other

scavengers were not effective in that regard, an observation that was similar to the one reported for the *Leishmania* model [34]. Finally, our results do not support the notion that virulence is associated with a lower ability to trigger (as opposed to priming) ROI secretion.

In conclusion, a low virulence strain of *M. avium* (strain 1983) induced TNF production by macrophages which, in turn, acted as a good priming agent for macrophage ROI production. This mycobacterium was susceptible to the hydrogen peroxide produced by macrophages and had, therefore, its growth restricted. Although this is a mechanism by which endogenously produced TNF caused bacteriostasis of strain 1983, other mechanisms are not excluded namely when macrophages are activated by  $\text{IFN}\gamma$  [3]. These results also suggest that at least one of the basis of the virulence of other *M. avium* strains such as strain 25291 might be based on the avoidance to induce TNF production and possibly downregulating the ability of infected macrophages to respond to TNF produced in the cellular environment.

## REFERENCES

- 1- Adams, L. B., J. B. Hibbs Jr., R. R. Taintor, and J. L. Krahenbuhl, 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 2725-2729.
- 2- Appelberg, R., A. G. Castro, J. Pedrosa, R. A. Silva, I. M. Orme, and P. Minóprio, 1994. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* 62: 3962-3971.
- 3- Appelberg, R. and I. M. Orme, 1993. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology* 80: 352-359.
- 4- Appelberg, R. and A. M. Sarmiento, 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: 324-331.
- 5- Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue, 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the *scid* mouse. *Immunol. Rev.* 124: 5-24.
- 6- Beckerman, K. P., H. W. Rogers, J. A. Corbett, R. D. Schreiber, M. L. McDaniel, and E. R. Unanue, 1993. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 150: 888-895.
- 7- Bermudez, L. E. M., 1993. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 277-281.
- 8- Bermudez, L. E., M. Wu, M. Petrofsky, and L. S. Young, 1992. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect. Immun.* 60: 4245-4252.

- 9- Bermudez, L. E. M. and L. S. Young, 1989. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. *Microb. Pathogen.* 7: 289-298.
- 10- Boockvar, K. S., D. L. Granger, R. M. Poston, M. Maybodi, M. K. Washington, J. B. Hibbs Jr, and R. L. Kurlander, 1994. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect. Immun.* 62: 1089-1100.
- 11- Brett, S. J. and R. Butler, 1988. Macrophage activity in resistant and susceptible mouse strains infected with *Mycobacterium lepraemurium*. *Immunology.* 63: 701-706.
- 12- Cenci, E., L. Romani, A. Mencacci, R. Spaccapelo, E. Schiaffella, P. Puccetti, and F. Bistoni, 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.* 23: 1034-1038.
- 13- Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom, 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175: 1111-1122.
- 14- Denis, M., 1991. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: Killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leuk. Biol.* 49: 380-387.
- 15- Denis, M. and E. O. Gregg, 1990. Recombinant tumor necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* 71: 139-141.
- 16- Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr, 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412.
- 17- Doi, T., M. Ando, T. Akaike, M. Suga, K. Sato, and H. Maeda, 1993. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* 61: 1980-1989.

- 18- Dunn, P. L. and R. J. North, 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* 59: 2892-2900.
- 19- Flesch, I. E. A. and S. H. E. Kaufmann, 1988. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* 56:1464-1469.
- 20- Frehel, C., C. de Chastellier, T. Lang and N. Rastogi, 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 52: 252-262.
- 21- Gangadharam, P. R. J. and C. K. Edwards III, 1984. Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130: 834-838.
- 22- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, S. Hieny, S. L. James, and A. Sher, 1992. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* 22: 2501-2506.
- 23- Granger, D. L., J. B. Hibbs Jr., J. R. Perfect, and D. T. Durack, 1988. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 81: 1129-1136.
- 24- Green, S. J., R. M. Crawford, J. T. Hockmeyer, M. S. Meltzer, and C. A. Nacy, 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 145: 4290-4297.
- 25- Haidaris, C. G. and P. F. Bonventre, 1982. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J. Immunol.* 129: 850-855.
- 26- Hamilton, T. A. and D. O. Adams, 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today.* 8: 151-158.

- 27- Harshan, K. V., and P. R. J. Gangadharam, 1991. In vivo depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of *Mycobacterium avium* complex in mice. *Infect. Immun.* 59: 2818-2821.
- 28- Hubbard, R. D., C. M. Flory and F. M. Collins, 1992. T-cell immune responses in *Mycobacterium avium*-infected mice. *Infect. Immun.* 60: 150-153.
- 29- Jonhston Jr, R. B., 1981. Secretion of superoxide anion, p. 489-497. In D. O. Adams, P. J. Edelson, and H. Koren (ed.) *Methods for studying mononuclear phagocytes*. Academic Press, New York.
- 30- Keller, R., R. Keist, P. H. van der Meide, P. Groscurth, M. Aguet, and T. P. Leist, 1987. Induction, maintenance and reinduction of tumoricidal activity in bone marrow-derived mononuclear phagocytes by *Corinebacterium parvum*. Evidence for the involvement of a T cell- and interferon- $\gamma$ -independent pathway of macrophage activation. *J. Immunol.* 138: 2366-2371.
- 31- Langermans, J. A. M., M. E. B. van der Hulst, P. H. Nibbering, P. S. Hiemstra, L. Fransen, and R. van Furth, 1992. IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 148: 568-574.
- 32- Liew, F. Y., S. Millott, C. Parkinson, R. M. J. Palmer, and S. Moncada, 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 4794-4797.
- 33- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 34- Murray, H. W., 1981. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 153: 1302-1315.
- 35- Murray, H. W. 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line: correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 153: 1690-1695.

- 36- Murray, H. W., 1982. Cell-mediated immune response in experimental leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.* 129: 351-357.
- 37- Murray, H. W., G. I. Byrne, C. D. Rothermel, and D. M. Cartelli, 1983. Lymphokine enhances oxygen-independent activity against intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 158: 234-239.
- 38- Murray, H. W., B. Y. Rubin, S. M. Carriero, A. M. Harris, and E. A. Jaffe, 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 1982-1988.
- 39- Nathan, C., N. Nogueira, C. Juangbhanich, J. Ellis, and Z. Cohn, 1979. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 149: 1056-1068.
- 40- Nussler, A., J.-C. Drapier, L. Renia, S. Pied, F. Miltgen, M. Gentilini, and D. Mazier, 1991. L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur. J. Immunol.* 21: 227-230.
- 41- Pabst, M. J., H. B. Hedegaard, R. B. Johnston Jr., 1982. Cultured human monocytes require exposure to bacterial products to maintain an optimal oxygen radical response. *J. Immunol.* 128: 123-128.
- 42- Perussia, B., 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 49-55.
- 43- Sarmiento, A. M. and R. Appelberg, 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis alpha production in infected mice and in *in vitro*-cultured mouse macrophages. *Infect. Immun.* 63: 3759-3764.
- 44- Sasada, M. and R. B. Johnston, 1980. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *J. Exp. Med.* 152: 85-98.



- 45- Sato, K., H. Tomioka and H. Saito, 1992. Differential susceptibilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to sodium nitrite. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2994-2995.
- 46- Stokes, R. W. and F. M. Collins, 1990. Passive transfer of immunity to *Mycobacterium avium* in susceptible and resistant strains of mice. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 109-115.
- 47- Saunders, B. M., and C. Cheers, 1995. Inflammatory response following intranasal infection with *Mycobacterium avium* complex: role of T-cell subsets and gamma interferon. *Infect. Immun.* 63: 2282-2287.
- 48- Tanaka, Y., C. Kiyotaki, H. Tanowitz, and B. R. Bloom, 1982. Reconstitution of a variant macrophage cell-line defective in oxygen metabolism with a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2584-2588.
- 49- Tomioka, H. and H. Saito, 1993. Macrophage chemiluminescence induced by interaction with transparent and opaque colonial variants of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3011-3015.
- 50- Vespa, G. N. R., F. Q. Cunha, and J. S. Silva, 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62: 5177-5182.
- 51- Vincendeau, P., and S. Daulouede, 1991. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma muscili* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol.* 146: 4338-4343.
- 52- Walker, L. and D. B. Lowrie, 1981. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. *Nature.* 293: 69-70.
- 53- Wallis, R. S., H. Fujiwara, and J. J. Ellner, 1986. Direct stimulation of monocyte release of interleukin 1 by mycobacterial protein antigens. *J. Immunol.* 136: 193-196.

## LEGENDS OF THE FIGURES

1- Kinetics of superoxide (A) and nitrite (B) production by resident peritoneal macrophages infected *in vitro* with *M. avium* strain 25291 or strain 1983. Macrophages were infected for 2 hours with  $10^7$  viable mycobacteria, washed and stimulated with PMA either immediately (time 0) or 3 or 7 days later (A). Supernatants from similar cultures were examined for nitrite content at the same time-points. The results are from a typical experiment and each value represents the mean of 3 determinations  $\pm$  standard deviation. Statistically significant differences between infected and uninfected macrophages are labeled \* for  $P < 0.05$  or \*\* for  $P < 0.01$ . N.D.-not detected.

2- Superoxide production by resident peritoneal macrophages infected or not with *M. avium* for 7 days and treated with an anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody (A) or different doses of recombinant mouse TNF- $\alpha$  (B). Macrophages were triggered with PMA and superoxide released detected as before. Results are represented as in the previous figures.

3- Superoxide production by macrophage-enriched peritoneal exudate cells from BALB/c mice intraperitoneally infected for 7 days with  $2 \times 10^8$  CFU of *M. avium* strain 25291 or strain 1983. Half of the animals were treated intravenously 3 hours prior to the infection with 2 mg of anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody. Control animals received the inoculum vehicle (0.5 ml of saline with 0.04% Tween 80). Macrophages were triggered with PMA and superoxide secretion was studied as before. Results are represented as in the previous figures.

4- Effects of four scavengers of ROI on *M. avium* strain 1983 growth in macrophages infected *in vitro* for 7 days. Results are presented as the log increase in CFU from day zero (immediately after washing out non-phagocytosed bacteria) to day 7. These results are representative of 3 different experiments. Statistically significant differences between controls and scavenger-treated macrophages are labeled \* for  $P = 0.012$  and \*\* for  $P = 0.000$ .

5- Ability of *M. avium* strain 25291 or strain 1983 to trigger the respiratory burst in resident peritoneal macrophages cultured *in vitro* for 2 days in the presence of 500 units of

TNF- $\alpha$ /ml. The results shown represent the mean of 3 replicate wells  $\pm$  standard variation. Statistically significant differences are labeled \* for  $P < 0.05$ .

6- Acid fast bacilli (AFB) counts in formazan-positive and formazan-negative bone marrow-derived macrophages. Macrophages were infected with  $10^7$  CFU of *M. avium* 25291 and cultured for 7 days. Each value represents the mean of AFB counts per macrophage (at least 400 cells were counted) in three slides. Data were statistically compared between formazan-positive and -negative cells and significant results are labeled \* for  $P < 0.05$ .

## TABLES

Table 1- Ability of two different doses of *M. avium* 1983 or 25291 to trigger superoxide secretion by uninfected or infected (i.e. primed with strain 1983 or strain 25291) resident peritoneal macrophages cultured in vitro for 7 days.

		TRIGGERING AGENT			
		1983		25291	
		10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
PRIMING AGENT	NONE	0	0	0	24.4±18.7
	1983	270±48.4	259±25.9	N.D.	N.D.
	25291	N.D.	N.D.	113±31.4	166±2.62

N.D.- not done.

Table 2- Effects of the number of inoculated bacteria on the capacity of infected BMMØ to produce superoxide anion, as measured by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. NBT was added to the BMMØ 24 hours after infection with *M. avium* 25291. The percentage of formazan-positive infected macrophages (F<sup>+</sup>) and of formazan-negative infected macrophages (F<sup>-</sup>) was determined by visual inspection of 1000 cells in 3 replica slides.

CFU inoculated/well	Ratio of F <sup>+</sup> /F <sup>-</sup> infected macrophages
$2 \times 10^6$	3.10
$1 \times 10^7$	0.54
$2 \times 10^7$	0.31

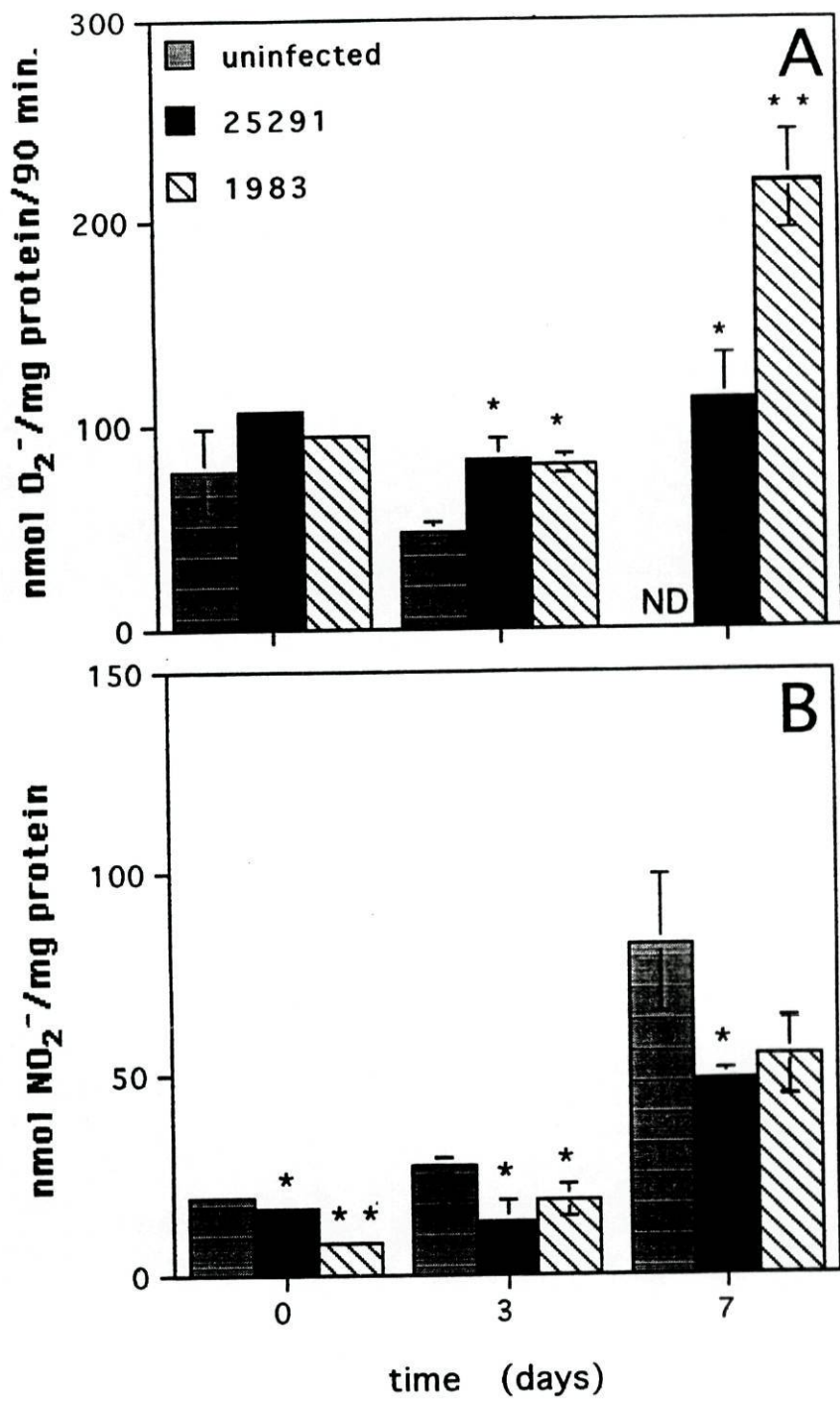


Fig. 1

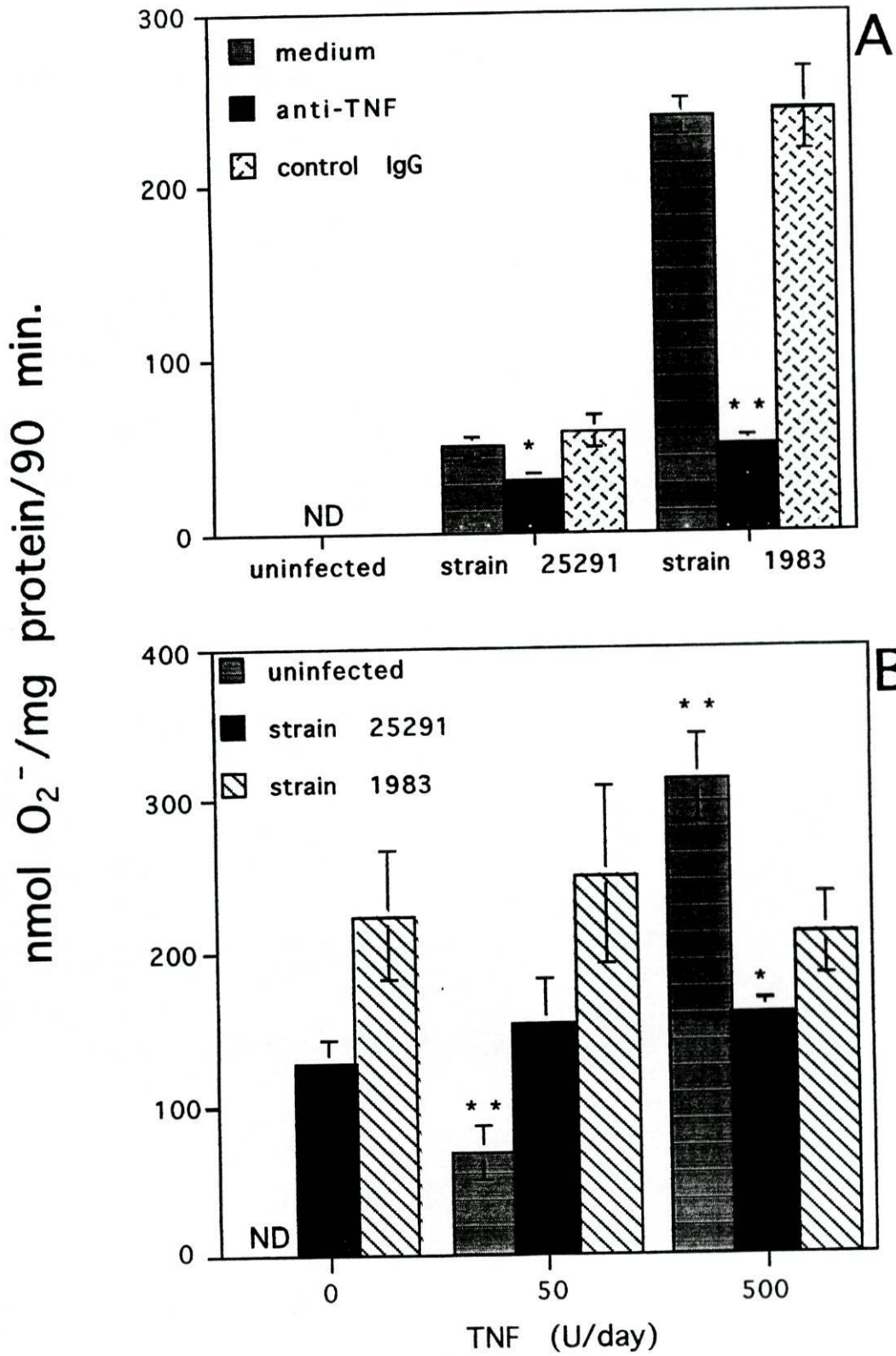


Fig. 2

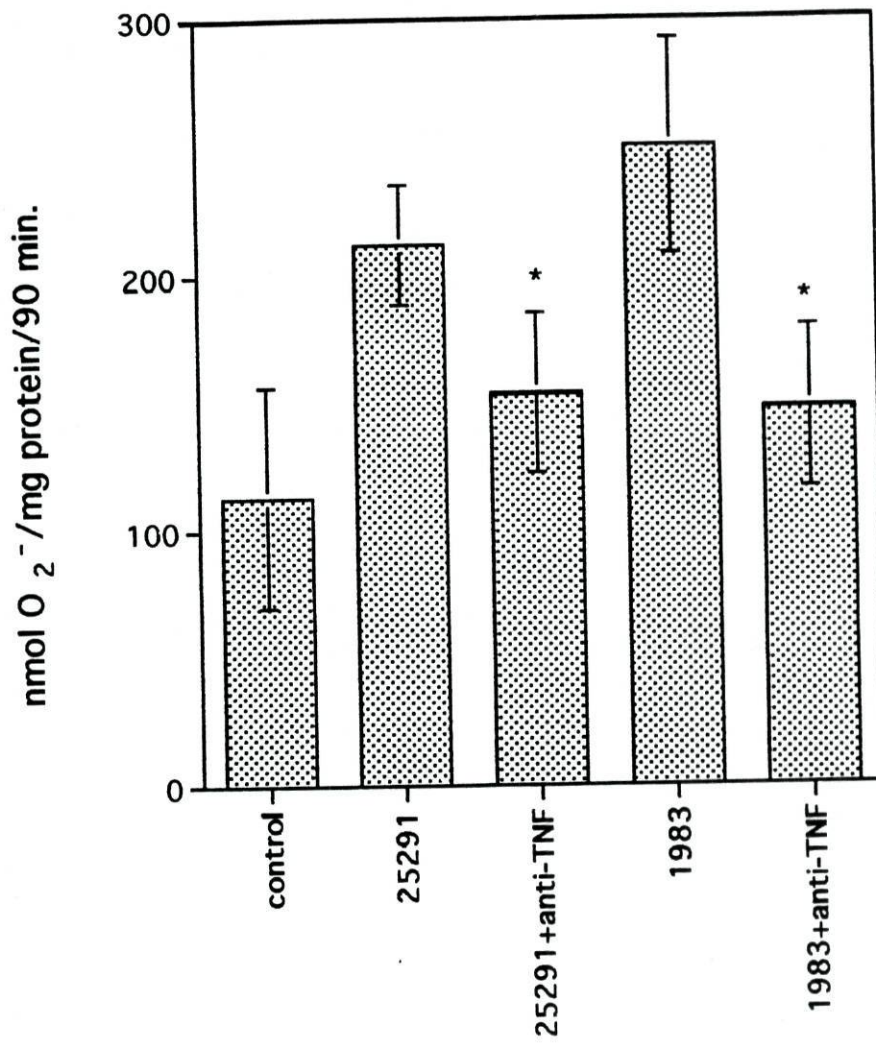


Fig.3



Increase in bacterial numbers (log 10)

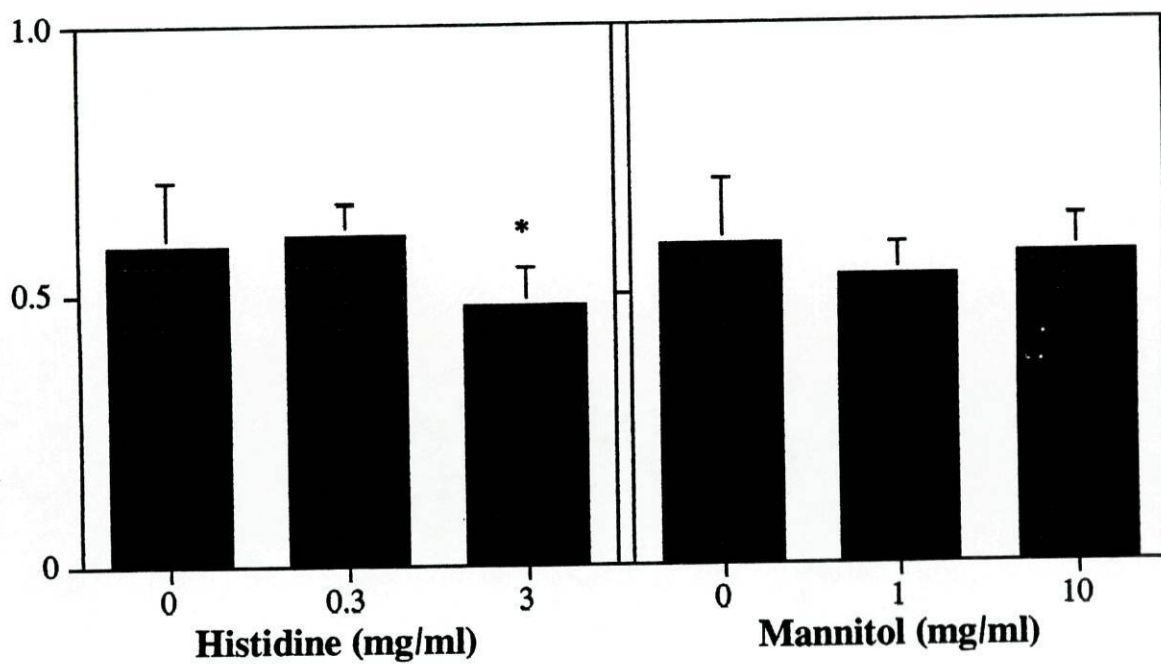
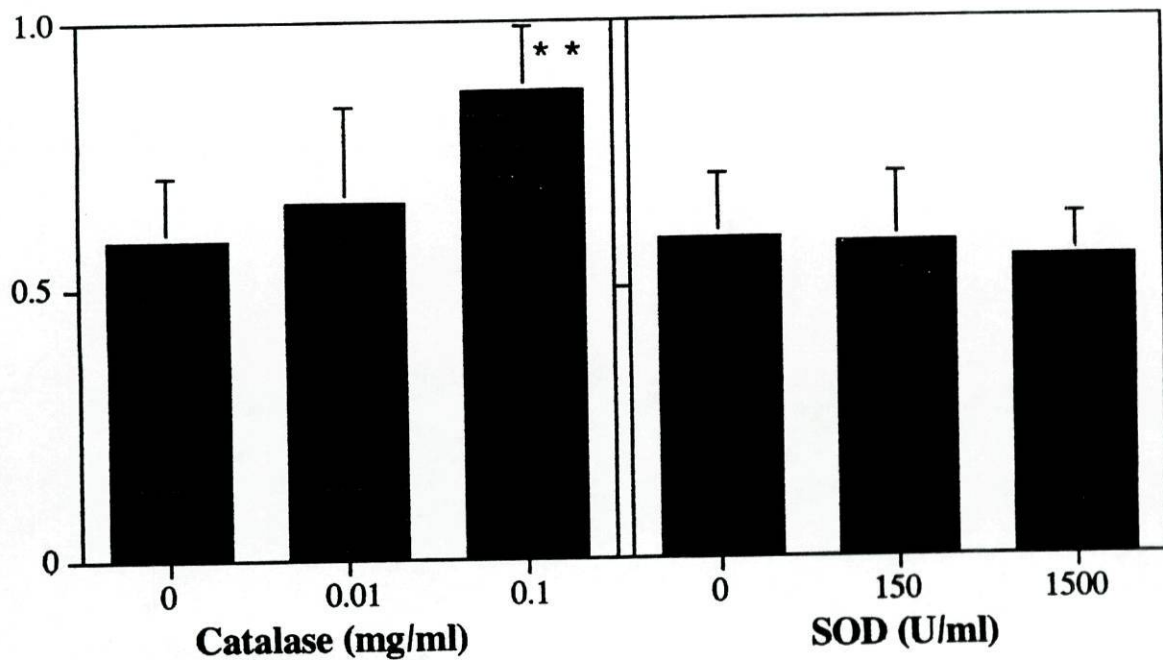


Fig. 4

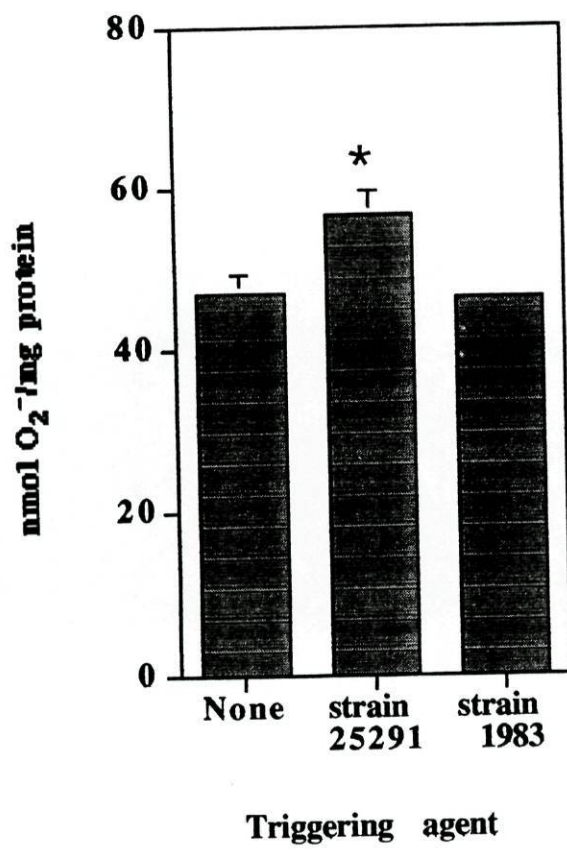


Fig. 5

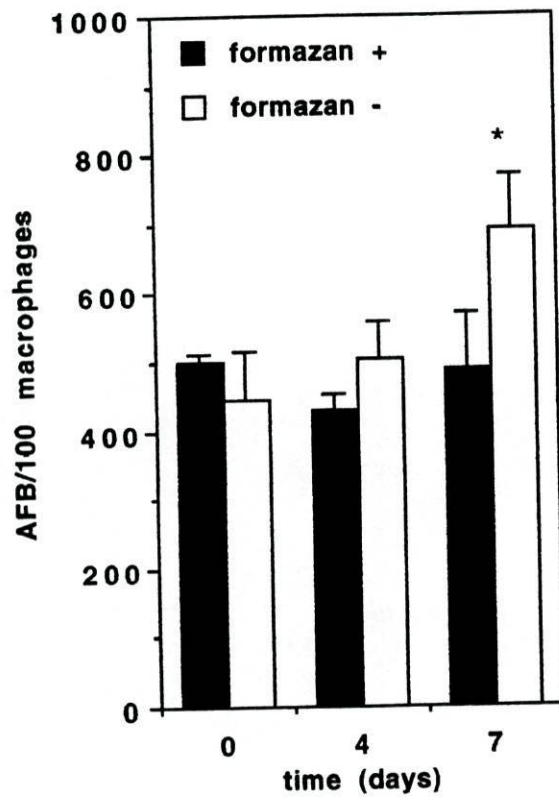


Fig.6

## DISCUSSÃO

*M. avium* é uma espécie micobacteriana constituída por múltiplas estirpes de diferente virulência podendo, ainda, cada uma destas estirpes apresentar diferentes morfotipos coloniais, cuja virulência difere também entre si. Uma dada estirpe, por sua vez, pode proliferar num hospedeiro ou ter o seu crescimento controlado por este, de acordo com características genéticas do hospedeiro, nomeadamente com o alelo do gene *Bcg* presente no caso da infecção murina. A compreensão dos mecanismos responsáveis por estas diferenças na virulência é de importância vital para se desenvolverem estratégias de combate à infecção por *M. avium*.

Como foi referido na Introdução desta tese, o TNF- $\alpha$  tem vindo a ser implicado como uma citocina fundamental no controlo da infecção por *M. avium*, tendo sido sugerido por vários autores que a indução ou não, pela micobactéria infectante, da produção desta molécula por células do sistema imune, poderá ser um importante factor de virulência. Assim, este trabalho teve como objectivo o estudo do envolvimento do gene *Bcg* na resistência natural do hospedeiro murino na infecção por *M. avium* e da participação do TNF- $\alpha$  nos mecanismos dessa resistência, assim como o estudo do envolvimento desta citocina na virulência entre diferentes estirpes/morfotipos de *M. avium*.

No artigo nº 1 demonstrou-se ser possível dividir as estirpes de ratinho estudadas em dois grupos, com base na resistência à infecção por *M. avium*. Nos ratinhos susceptíveis ocorreu um crescimento bacteriano progressivo levando à morte dos animais, enquanto que os ratinhos resistentes controlaram a infecção inibindo o crescimento bacteriano, não chegando a demonstrar sinais de doença. Das sete estirpes de ratinho estudadas, as quatro susceptíveis expressavam o alelo *Bcg<sup>s</sup>*, e as três resistentes o alelo *Bcg<sup>r</sup>*. Estes resultados completam outros, descritos por Orme e colaboradores (Orme et al, 1986) e Stokes e colaboradores (Stokes et al, 1986), nomeadamente pela demonstração de que o gene *Bcg* é o principal determinante da resistência contra *M. avium* no controlo da infecção utilizando o par de ratinhos

congênicos BALB/c e BALB/c.*Bcg*<sup>r</sup> (C.D2), tendo esta última estirpe sido obtida por Potter et al (Potter et al, 1983). A presença do segmento do cromossoma 1 contendo o gene *Bcg*<sup>r</sup> tornou os ratinhos BALB/c resistentes à infecção. Não se exclui, porém, que outros genes desempenhem também um papel na resistência do ratinho às micobactérias (Orme et al, 1986). Os efeitos do gene *Bcg*<sup>s</sup> permitindo a proliferação de *M. avium*, puderam ser observados tanto na fase inicial como na fase mais tardia da infecção, quando a imunidade celular já estava estabelecida. A capacidade inata dos ratinhos C.D2 para restringir o crescimento de *M. avium* demonstrou ser independente do TNF- $\alpha$  (vide artigo nº 3), uma vez que a neutralização desta citocina não afectou significativamente o crescimento de ambas as estirpes de *M. avium* nestes ratinhos. É, assim, provável que o gene *Bcg* afecte essencialmente mecanismos antibacterianos do macrófago e não a regulação autócrina da função macrofágica através da libertação de citocinas.

Nos ratinhos infectados, os níveis da activação macrofágica para a actividade antibacteriana não específica e produção de peróxido de hidrogénio (vide artigo nº 1) foram tanto ou mais elevados nas estirpes susceptíveis comparativamente às estirpes resistentes. A secreção de RNI mostrou não estar sujeita a nenhum padrão de resistência/susceptibilidade à infecção por *M. avium*. No entanto, qualquer um dos três parâmetros da activação macrofágica estudados representam marcadores de alterações funcionais do macrófago, podendo não representar o mecanismo molecular da actividade antimicobacteriana. É também possível que, uma vez que a população de macrófagos estudada continha apenas uma minoria de células infectadas, os macrófagos contendo micobactérias no seu interior não estivessem a expressar o mesmo padrão geral de activação macrofágica. Isto é sugerido pelos resultados obtidos com a estirpe ATCC 25291 no artigo nº 4, em que se observou que os macrófagos contendo maior número de bacilos aos 7 dias de infecção não estavam activados para a produção de superóxido. Porém, o controlo do crescimento do *M. avium* em ratinhos resistentes pode ser explicado pela presença de uma função antibacteriana mais eficiente em macrófagos *Bcg*<sup>r</sup>, ou pela falta de um meio ambiente favorável ao crescimento de

*M. avium* nestes macrófagos. A activação macrofágica global na população peritoneal dos ratinhos infectados mostrou ser directamente proporcional à carga bacteriana nestes animais. Este dado sugere que, na presença de grande quantidade de antígeno ou quando a susceptibilidade inata permite a proliferação bacteriana, as células T são mais activas na regulação das funções macrofágicas ou, alternativamente, os macrófagos são activados directamente por produtos micobacterianos, os quais podem induzir a produção de moléculas macrofágicas (como por exemplo, o TNF- $\alpha$ ) que actuarão autócrina/parácrinamente na activação desta população de macrófagos.

A diferença na resistência à infecção por *M. avium* entre ratinhos BALB/c e C.D2 foi também observada *in vitro* em culturas de RPMØ provenientes de cada uma das estirpes (vide artigo nº 1). Esta diferença manteve-se mesmo após activação macrofágica *in vitro* utilizando linfocinas derivadas de células T esplénicas. Uma vez que o estímulo activador utilizado foi o mesmo para as duas populações de macrófagos estudadas, este resultado sugere que a susceptibilidade se deve a uma função antibacteriana defeituosa nos macrófagos *Bcg*<sup>s</sup>, que não pôde ser completamente ultrapassada pela activação imunológica.

Conforme é referido na Introdução, a variação morfotípica de SmTr para SmOp é, frequentemente, associada com perda da virulência. Assim, no artigo nº 2 foram estudados dois morfotipos coloniais da estirpe *M. avium* 2.151 quanto à virulência e capacidade de induzir TNF- $\alpha$  em ratinhos e BMMØ murinos, tendo sido também avaliado o efeito da adição de anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  na infecção *in vivo* e *in vitro*. Como previsto, os morfotipos SmTr e SmOp comportaram-se de maneira diferente quer após a infecção de ratinhos ou de macrófagos isolados. A infecção pela variante SmOp foi controlada antes do aparecimento de uma resposta imune protectora, e antes que a bactéria fosse capaz de proliferar. Este facto sugeriu que o macrófago ao ser infectado pela micobactéria teria sido induzido a produzir algo que controlasse o crescimento da variante SmOp, nomeadamente TNF- $\alpha$ . Porém, *in vitro*, nem a variante SmOp nem a variante SmTr induziram a secreção de TNF- $\alpha$  por BMMØ, contrariando dados obtidos préviamente utilizando uma técnica de ELISA para a

detecção desta citocina (Furney et al, 1992). No entanto, ainda seria possível que o TNF- $\alpha$  estivesse a ser produzido em níveis inferiores ao limite de sensibilidade do ensaio e actuasse de forma autócrina nos macrófagos infectados. Por este motivo foi testada a hipótese de que a secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos conseguisse induzir o controlo da proliferação bacteriana da variante avirulenta (SmOp) desde o início da infecção. No entanto, a neutralização do TNF- $\alpha$  *in vitro* ou *in vivo* não teve qualquer efeito na eliminação da variante SmOp, tendo sido abandonada a hipótese levantada previamente.

A neutralização do TNF- $\alpha$  em culturas de macrófagos infectados com o morfotipo virulento SmTr também não afectou o seu crescimento. Porém, a proliferação *in vivo* desta variante foi aumentada pela neutralização do TNF- $\alpha$  endógeno. Este aumento tornou-se evidente após as duas primeiras semanas de infecção, sugerindo que para que os níveis de TNF- $\alpha$  fossem evidentes e capazes de induzir alguma bacteriostase seria necessário que a produção desta citocina fosse estimulada por factores envolvidos na fase da resposta imune adquirida. Foi também avaliada, *in vivo*, a capacidade de produção de TNF- $\alpha$  de ratinhos infectados com várias estirpes de *M. avium*, após estimulação com endotoxina (um potente agonista da produção desta citocina). Verificou-se que apenas as estirpes virulentas foram capazes de induzir essa secreção, sendo esta indução mais evidente após quatro semanas de infecção. Uma vez que está descrito que o IFN- $\gamma$  está envolvido na estimulação da secreção de TNF- $\alpha$  durante a infecção *in vivo* por *M. avium* virulento (Appelberg et al, 1994), é possível que também nesta situação células T ou NK tenham sido estimuladas a secretarem IFN- $\gamma$  o qual, por sua vez, estimularia a produção de TNF- $\alpha$ .

Com base nestes resultados, pôde-se concluir que a não virulência do morfotipo SmOp não está relacionada com a indução de TNF- $\alpha$ , podendo antes depender da susceptibilidade inata desta variante aos mecanismos antimicrobianos expressos constitutivamente pelo macrófago, sem necessitarem de ser activados através de citocinas.

Para alargar estes resultados, foi também estudada a capacidade de indução de

TNF- $\alpha$  e os efeitos da sua neutralização *in vivo* e *in vitro* na infecção por duas outras estirpes de *M. avium*, diferindo na virulência (vide artigo nº 3): as estirpes 25291 e 1983. A estirpe 1983 (de baixa virulência) foi capaz de uma maior indução da secreção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos cultivados *in vitro*, do que a estirpe 25291 (de alta virulência). Estes resultados estão em acordo com os de outros autores, que, trabalhando com BMM $\emptyset$  e macrófagos humanos derivados do sangue periférico, relacionam a virulência das estirpes com a falta de indução de TNF- $\alpha$  (Furney et al, 1992; Fattorini et al, 1994). Para estudar a relação entre as micobactérias e os macrófagos na fase inicial da infecção, foram escolhidos macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ratinhos não tratados, ou seja, RPM $\emptyset$ , para o trabalho apresentado no artigo nº 3, os quais representam uma população macrofágica residente e, portanto, a primeira a entrar em contacto com o agente patogénico *in vivo*. A indução da produção de TNF- $\alpha$  observada foi independente da estimulação por outras citocinas, como IFN- $\gamma$ , que pudessem ter sido produzidas por células T ou NK, uma vez que a depleção de células CD4+, CD8+ e NK 1.1+ não afectou a secreção de TNF- $\alpha$ .

Os estudos mencionados acima (Furney et al, 1992; Fattorini et al, 1994) não avaliaram de facto o papel do TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos infectados, uma vez que a hipótese de que as estirpes avirulentas não proliferavam devido à indução de produção precoce de TNF- $\alpha$  na infecção foi apenas baseada na observação de uma associação entre virulência e não secreção de TNF- $\alpha$ . Esta hipótese foi testada neste trabalho (artigo nº 3), utilizando anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ , quer *in vivo* quer *in vitro*. A neutralização do TNF- $\alpha$  durante a infecção de RPM $\emptyset$  com a estirpe 1983 *in vitro* potenciou o crescimento desta estirpe para um nível semelhante ao atingido pela estirpe ATCC 25291, mas não apresentou qualquer efeito no crescimento desta última estirpe. Assim, induzindo a síntese de TNF- $\alpha$  por RPM $\emptyset$ , a estirpe 1983 teve o seu crescimento controlado pelos macrófagos infectados.

O crescimento da estirpe ATCC 25291 não foi afectado pela adição exógena de TNF- $\alpha$  às culturas de macrófagos infectados, o que está em contraste com resultados prévios demonstrando que o TNF- $\alpha$  por si só era capaz de induzir bacteriostase para



esta estirpe de *M. avium*, em BMMØ (Appelberg e Orme, 1993). Isto poder-se-á dever ao facto de os RPMØ responderem menos eficientemente à acção do TNF- $\alpha$  do que os BMMØ, ou a estarem envolvidas outras citocinas na indução da bacteriostase, para estes macrófagos. Pode também ser que a estirpe ATCC 25291 induza a falta de resposta dos RPMØ ao TNF- $\alpha$ , uma vez que existem referências na literatura que uma proteína de superfície de 33 kDa existente no *M. avium* interfere com a regulação da transcrição em macrófagos derivados do sangue periférico humano, afectando a resposta destas células à estimulação com TNF- $\alpha$  (Inderlied et al, 1993). Também está referido que a IL-6 (Bermudez et al, 1992) e o TGF- $\beta$  (Bermudez, 1993a) impedem a activação dos macrófagos derivados do sangue periférico humano em resposta ao TNF- $\alpha$ , podendo a produção daquelas citocinas ser induzida nos macrófagos pelo *M. avium*.

A neutralização do TNF- $\alpha$  *in vivo* em ratinhos BALB/c infectados com *M. avium* 1983 impediu a eliminação bacteriana no fígado e a bacteriostase no baço, sugerindo a existência de uma actividade anti-micobacteriana TNF-dependente contra a estirpe 1983 nestes órgãos. A neutralização do TNF- $\alpha$  em ratinhos BALB/c infectados com a estirpe de alta virulência demonstrou um ligeiro efeito no seu crescimento, apenas observado tardiamente na infecção quando a estimulação do macrófago para a produção de TNF- $\alpha$  por mediadores da resposta imune (como o IFN- $\gamma$ ) teria, com certeza, ocorrido. Estes resultados sugerem que a indução precoce da produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos pela estirpe 1983 *in vivo* pode ser relevante para a restrição do crescimento desta estirpe, quando a imunidade dependente das células T ainda não está estabelecida. Porém, o TNF- $\alpha$  não é provavelmente o único factor responsável pela baixa proliferação desta estirpe *in vivo*, uma vez que, mesmo após neutralização desta citocina, a estirpe 1983 cresceu consideravelmente menos do que a estirpe ATCC 25291.

Com o objectivo de aprofundar os resultados descritos no artigo nº 3, tentou-se identificar o mecanismo envolvido na restrição do crescimento da estirpe 1983 pelos RPMØ. Embora os RNI e os ROI participem na restrição do crescimento de vários microrganismos, e não pareçam estar envolvidos no controlo da proliferação de estirpes

virulentas de *M. avium* (vide Introdução), pouco se sabe do seu papel na bacteriostase de macrófagos contra estirpes de *M. avium* de baixa virulência. Por este motivo, e uma vez que o TNF- $\alpha$  está envolvido na estimulação da produção de ROI e RNI, avaliou-se se estes mecanismos efectores do macrófago participavam na bacteriostase TNF- $\alpha$ -dependente contra a estirpe 1983 *in vitro*. Os resultados foram comparados com os obtidos com a estirpe 25291, para analisar as bases da virulência desta estirpe (vide artigo nº 4).

Ambas as estirpes de *M. avium* estimularam a produção de ROI pelos macrófagos na ausência de células T e NK, ou dos seus produtos. A estirpe 1983 estimulou uma produção de anião superóxido 2-5 vezes superior à da estirpe 25291 para uma carga bacteriana equivalente, dependendo das experiências. Pelo contrário, nenhuma destas estirpes estimulou a secreção de RNI; de facto, os macrófagos infectados sofreram um decréscimo na secreção de nitritos, comparativamente aos macrófagos não infectados. O aumento na produção de nitritos observado com a adição de SOD às culturas de RPMØ, demonstrou que o superóxido produzido pelos macrófagos infectados pelo *M. avium* estaria a actuar como inibidor do óxido nítrico. Estes resultados, assim como outros anteriores (Appelberg e Orme, 1993) mostrando não haver associação entre o crescimento dos morfotipos SmTr e SmOp da estirpe 2-151 observado em BMMØ e a indução de RNI por estes morfotipos, levaram a que o papel dos RNI não continuasse a ser testado por nós.

O TNF- $\alpha$  induzido pela estirpe 1983 nos macrófagos (vide artigo nº 3), estimulou a produção de superóxido de modo autócrino/parácrino (artigo nº 4). Por outro lado a estirpe 25291, fraca indutora da síntese de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (vide artigo nº 3), induziu baixos níveis de secreção de superóxido (artigo nº 4). Foi, assim, demonstrada a existência de um mecanismo TNF- $\alpha$ -dependente para a produção de anião superóxido por macrófagos infectados por *M. avium*. Este mecanismo foi também observado *ex vivo*, em macrófagos peritoneais de ratinhos BALB/c infectados i.p. com cada uma das estirpes micobacterianas. Nesta situação, não encontramos diferenças significativas na produção de superóxido entre macrófagos dos ratinhos

infectados com a estirpe 25291 ou com a estirpe 1983, provavelmente devido à presença de outros factores, como por exemplo, factores secretados por células NK ou factores séricos, os quais podem ter interferido com a produção de ROI *in vivo*.

A adição de TNF- $\alpha$  a culturas de RPMØ infectados com *M. avium* 1983 não aumentou a produção de superóxido, provavelmente devido a estas células já se encontrarem activadas e não ser possível responderem a novos estímulos. Embora a estirpe 25291 não seja boa estimuladora da secreção de TNF- $\alpha$  pelos RPMØ, os macrófagos infectados com esta estirpe também não responderam bem à incubação com TNF- $\alpha$  no que respeita à estimulação para a produção de ROI. Para além deste facto, não foi possível detectar produção de superóxido no interior de macrófagos maciçamente infectados com a estirpe 25291, após ensaio com NBT em células *in situ*. Assim, é provável que a estirpe virulenta possa deprimir a capacidade dos macrófagos para sintetizarem ROI, ou que estes bacilos em grande número no interior dos macrófagos possam eliminar o superóxido que esteja a ser produzido. No artigo nº 1, foi descrito um aumento da produção de ROI por macrófagos peritoneais de ratinhos BALB/c infectados com a estirpe 25291 aos 30 dias de infecção. Nesta situação, as micobactérias proliferavam extensivamente, apesar dos macrófagos estarem activados para a produção de ROI. Esta aparente contradição pode ser explicada pelos resultados apresentados no artigo nº 4 os quais mostram que, embora ocorra uma estimulação geral da população macrofágica, os bacilos podem estar a inibir ou destruir os ROI que estejam a ser produzidos pelos macrófagos peritoneais infectados, os quais são uma minoria entre os macrófagos presentes no local da infecção. A síntese de outros mediadores (por exemplo, IL-6) pelos macrófagos infectados com a estirpe 25291, pode causar diminuição da expressão de receptores membranares do TNF- $\alpha$ , fazendo também com que estes fagocitos não respondam bem à estimulação pelo TNF- $\alpha$  (Bermudez et al, 1992; Denis e Gregg, 1990).

A associação entre a indução da secreção de TNF- $\alpha$  com a indução de bacteriostase e estimulação da secreção de ROI, levou a que fosse testado o papel directo dos ROI na bacteriostase. A adição de catalase aos macrófagos infectados com

*M. avium* 1983 mostrou que esta estirpe é susceptível ao peróxido de hidrogénio produzido pelo fagocito. A adição de outros inibidores não teve qualquer efeito, um resultado semelhante ao encontrado para o modelo *Leishmania* (Murray, 1981), o que indica que o anião superóxido ou o radical hidróxilo não estão envolvidos na restrição do crescimento da estirpe 1983.

O artigo nº 4 demonstrou, então, que uma estirpe de *M. avium* de baixa virulência (estirpe 1983) induziu a produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos, o qual actuou como um forte agente estimulador para a produção de ROI pelos macrófagos. Esta estirpe demonstrou ser susceptível à acção do peróxido de hidrogénio produzido por aqueles fagocitos, sendo assim restringido o seu crescimento. Embora este seja um mecanismo pelo qual o TNF- $\alpha$  produzido endógenamente causou bacteriostase da estirpe 1983, outros mecanismos não estão excluídos, nomeadamente, quando os macrófagos são activados pelo IFN- $\gamma$  (Appelberg e Orme, 1993). Estes resultados sugerem que pelo menos uma das bases da virulência de outras estirpes de *M. avium*, como a estirpe 25291, pode consistir na possibilidade de não indução da produção de TNF- $\alpha$  e, possivelmente, num decréscimo da capacidade de resposta dos macrófagos infectados à acção do TNF- $\alpha$  produzido no ambiente celular.

As seguintes conclusões principais da presente dissertação podem ser referidas:

- O gene *Bcg* desempenha um importante papel no controlo da resistência à infecção por *M. avium* no ratinho. Esta resistência é independente da presença de TNF- $\alpha$  e está relacionada com uma função macrofágica, parecendo ser independente do estabelecimento de uma resposta imune protectora, e também da regulação autócrina/parácrina da função macrofágica por citocinas.

- a diferença de virulência entre estirpes de *M. avium* pode-se dever a variadas razões. Para algumas estirpes, como é o caso da estirpe 1983, a baixa virulência será devida à capacidade de estimular a produção de TNF- $\alpha$  pelo macrófago, o qual vai

desempenhar um papel importante na activação autócrina/parácrina destas células para a função antimicobacteriana. Para a estirpe 1983 esta função consiste, pelo menos em parte, na secreção de peróxido de hidrogénio. Para outras estirpes, ou no caso analisado no artigo nº 2 para diferentes morfotipos da mesma estirpe, como os morfotipos SmTr e SmOp da estirpe 2.151, a razão da diferença de virulência poder-se-á dever a outras causas. Assim, a não-virulência do morfotipo SmOp dependerá, provavelmente, da susceptibilidade inata deste morfotipo aos mecanismos antimicrobianos expressos constitutivamente pelo macrófago.

- O TNF- $\alpha$  está envolvido na resistência à infecção *in vivo* pela estirpe de baixa virulência *M. avium* 1983, cujo crescimento é controlado devido à capacidade de esta estirpe induzir a secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos; esta citocina está também envolvida no controlo da infecção *in vivo* por *M. avium* virulento (como é o caso das estirpes 25291 e 2.151 SmTr) uma vez que, embora ambas as estirpes sejam fracas indutoras da secreção de TNF- $\alpha$ , a produção desta molécula é induzida aquando do estabelecimento da resposta imune, podendo então desempenhar a sua função micobacteriostática.

## REFERÊNCIAS

- Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S.** 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 150:5080-5085.
- Alliot, F., Licain, E., Grima, B., Pessac, B.** 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 88:1541-1545
- Andrew, P.W., Jackett, P.S., Lowrie, D.B.** 1985. Killing and degradation of microorganisms by macrophages. *in* Dean and Jessup eds. *Mononuclear phagocytes: physiology and pathology.* Elsevier Science Publishers B.V. pp. 311-335
- Anthony, L.S.D., Morrissey, P.J., Nano, F.E.** 1992. Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN- $\gamma$ -activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *J.Immunol.* 148:1829-1834.
- Antoine, J.-C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P.** 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect.Immun.* 58:779-787
- Antunes, M.L.** 1993. Tuberculose em Portugal: epidemiologia. *Arq.S.P.P.R.* 10:207-217
- Anz, W., Meissner, G.** 1972. Comparative virulence tests in chickens with transparent and opaque colonies of strains of avian mycobacteria of different serotypes. *Zbl.Bact.Hyg.A.* 221:334-342
- Appelberg, R.** 1992a. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J.Leuk.Biol.* 51:472-477
- Appelberg, R.** 1992b. Macrophage inflammatory proteins MIP-1 and MIP-2 are involved in T cell-mediated neutrophil recruitment. *J.Leukoc.Biol.* 52:303-306
- Appelberg, R.** 1992c. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and macrophage inflammatory proteins (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.* 89:269-273
- Appelberg, R.** 1995. Opposing effects of interleukin-10 on mouse macrophage functions. *Scand.J.Immunol.* 41:539-544

**Appelberg,R., Castro,A.G., Pedrosa,J., Silva,R.A., Orme,I.M., Minóprio,P.** 1994. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect.Immun.* 62:3962-3971

**Appelberg,R., Castro,A.G., Gomes,S., Pedrosa,J., Silva,M.T.** 1995. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium* : role of neutrophils. *Infect.Immun.* 63:3381-3387

**Appelberg,R., Orme,I.M.** 1993. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunol.* 80:352-359

**Appelberg,R., Silva,M.T.** 1989. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin.Exp.Immunol.* 78:478-483

**Arala-Chaves,M.P., Ribeiro,A.S., Santarém,M.M.G., Coutinho,A.** 1986. Strong mitogenic effect for murine B lymphocytes of an immunosuppressor substance released by *Streptococcus intermedius*. *Infect.Immun.* 54:543-548

**Armstrong,J.A., D'Arcy Hart,P.** 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J.Exp.Med.* 134:713-740

**Bancroft,G.J.** 1993. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr.Opin.Immunol.* 5:503-510.

**Bancroft,G.J., Bosma,M.J., Bosma,G.C., Unanue,E.R.** 1986. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. *J.Immunol.* 137:4-9

**Bancroft, G.J., Schreiber,R.D., Bosma,G.C., Bosma,M.J., Unanue,E.R.** 1987. A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-g. *J.Immunol.* 139:1104-1107

**Bancroft,G.J., Sheehan,K.C.F., Schreiber,R.D., Unanue,E.R.** 1989. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. *J.Immunol.* 143:127-130

**Barnes,P.F., Chatterjee,D., Brennan,P.J., Rea,T.H., Modlin,R.L.** 1992. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect.Immun.* 60:1441-1446

**Barrow,W.W., Ullom,B.P., Brennan,P.J.** 1980. Peptidoglycolipid nature of the superficial cell wall sheath of smooth colony-forming mycobacteria. *J.Bacteriol.* 144:814-822.

**Bastian,N.R., Hibbs,Jr.,J.B.** 1994. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr.Opin.Immunol.* 6:131-139.

**Beaman,M.H., Wong,S.-Y., Remington,J.S.** 1992. Cytokines, Toxoplasma and intracellular parasitism. *Immunolog.Rev.* 127:97-117

**Belisle,J.T., Brennan,P.J.** 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J.Bacteriol.* 171:3465-3470.

**Benson,C.A.** 1994. Treatment of disseminated disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS. *Clin.Infect.Dis.* 18:S237-S242

**Benson,C.A., Ellner,J.J.** 1993. *Mycobacterium avium* complex infection and AIDS: advances in theory and practice. *Clin.Infect.Dis.* 17:7-20.

**Bermudez,L.E.** 1993a. Production of transforming growth factor- $\beta$  by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- $\gamma$ . *J.Immunol.* 150:1838-1845

**Bermudez,L.E.** 1993b. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin.Exp.Immunol.* 91:277-281.

**Bermudez,L.E., Champsi, J.** 1993. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect.Immun.* 61:3093-3097.

**Bermudez,L.E.M., Kolonoski,P., Young,L.S.** 1990a. Natural killer cell activity and macrophage-dependent inhibition of growth or killing of a *Mycobacterium avium* complex in a mouse model. *J.Leuk.Biol.* 47:135-141

**Bermudez,L.E.M., Stevens,P., Kolonoski,P., Wu,M., Young,L.S.** 1989. Treatment of experimental disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant IL-2 and tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 143:2996-3000.

**Bermudez,L.E., Wu,M., Petrofsky,M., Young,L.S.** 1992. Interleukin-6 antagonizes tumor



necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobacterial activities in macrophages. *Infect.Immun.* 60:4245-4252

**Bermudez,L.E., Wu,M., Young, L.S.** 1995. Interleukin-12-stimulated natural killer cells can activate human macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium*. *Infect.Immun.* 63:4099-4104

**Bermudez,L.E.M., Young,L.S.** 1987. Phagocytosis and intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex by human and murine macrophages. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* 20:191-201.

**Bermudez,L.E.M., Young,L.S.** 1988. Tumor necrosis factor alone or in combination with IL-2, but not interferon- $\gamma$ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J.Immunol.* 140:3006-3013

**Bermudez,L.E.M., Young,L.S.** 1990. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates human macrophages to inhibit growth or kill *Mycobacterium avium* complex. *J.Leuk.Biol.* 48:67-73.

**Bermudez,L.E.M., Young,L.S.** 1991. Natural killer cell-dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. *J.Immunol.* 146:265-270

**Bermudez,L.E., Young,L.S., Enkel,H.** 1991. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect.Immun.* 59:1697-1702

**Bermudez,L.E.M., Young,L.S., Gupta,S.** 1990b. 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent inhibition of growth or killing of *Mycobacterium avium* complex in human macrophages is mediated by TNF and GM-CSF. *Cell.Immunol.* 127:432-441

**Birdi,T.J., Antia,N.H.** 1989. The macrophage in leprosy: a review on the current status. *Int.J.Lepr.* 57:511-525.

**Black,C.M., Paliescheskey,M., Beaman,B.L., Donovan,R.M., Goldstein,E.** 1986. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by *Nocardia asteroides*. *J.Infect.Dis.* 154:952-958

**Blackwell,J.M., Roach,T.I.A., Atkinson,S.E., Ajioka,J.W., Barton,C.H., Shaw,M.-A.** 1991. Genetic regulation of macrophage priming/activation: the *Lsh* gene story. *Immunol.Letters.* 30:241-248

- Bliska,J.B., Galán,J.E., Falkow,S.** 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell.* 73:903-920.
- Bloom,B.R., Mehra,V.** 1984. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunolog.Rev.* 80:5-28.
- Bogdan,C., Gessner,A., Röllinghoff,M.** 1993. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiol.* 189:356-396.
- Bonta,I.L., Ben-Efraim,S., Mózes,T., Fieren,M.W.J.A.** 1991. Tumor necrosis factor in inflammation: relation to other mediators and to macrophage antitumor defence. *Pharmacol.Res.* 24:115-130
- Boockvar,K.S., Granger,D.L., Poston,R.M., Maybodi,M., Washington,M.K., Hibbs Jr,J.B., Kurlander,R.L.** 1994. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect.Immun.* 62:1089-1100
- Boom,W.H., Wallis,R.S., Chervenak,K.A.** 1991. Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4+ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. *Infect.Immun.* 59:2737-2743
- Bradley,D.J., Taylor,B.A., Blackwell J.M., Evans E.P., Freeman,J.** 1979. Regulation of *Leishmania* populations within the host.III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin.Exp.Immunol.* 37:7-14.
- Brett,S.J., Ivanyi,J.** 1990. Genetic influences on the immune repertoire following tuberculosis infection in mice. *Immunol.* 71:113-119
- Brett,S., Orrell,J.M., Beck,J.,S., Ivanyi,J.** 1992. Influence of H-2 genes on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of chronically infected mice. *Immunol.* 76:129-132
- Brock,T.D., Madigan,M.T.** 1991. Host-parasite relationships. in "Biology of Microorganisms"-6th Ed., Prentice-Hall,Inc. pp:387-425
- Brown,I.N., Glynn,A.A., Plant,J.** 1982. Inbred mouse strain resistance to *Mycobacterium lepraemurium* follows the *Ity/Lsh* pattern. *Immunol.* 47: 149-156
- Brown,A.E., Holzer,T.J., Andersen,B.R.** 1987. Capacity of human neutrophils to kill

*Mycobacterium tuberculosis*. J.Infect.Dis. 156:985-989

**Brownback,P.E., Barrow,W.W.** 1988. Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. Infect.Immun. 56:1044-1050

**Cameron,M.L., Granger,D.L., Weinberg,J.B., Kozumbo,W.J., Koren,H.S.** 1990. Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. Am.Rev.Resp.Dis. 142:1313-1319.

**Campbell,E.J., Silverman,E.K., Campbell,M.A.** 1989. Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. J.Immunol. 143:2961-2968

**Castro,A.G., Minóprio,P., Appelberg,R.** 1995a. The relative impact of bacterial virulence and host genetic background on cytokine expression during *Mycobacterium avium* infection of mice. Immunol. 85:556-561

**Castro,A.G., Silva,R.A., Appelberg,R.** 1995b. Endogenously produced IL-12 is required for the induction of protective T cells during *Mycobacterium avium* infections in mice. J.Immunol. 155:2013-2019

**Champsi,J., Young,L.S., Bermudez,L.E.** 1995. Production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and TGF- $\beta$ , and expression of receptors for TNF- $\alpha$  and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection. Immunol. 84:549-554

**Chan,J., Fujiwara,T., Brennan,P., McNeil,M., Turco,S.J., Sibille,J.-C., Snapper,M., Aisen,P., Bloom,B.R.** 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. Proc.Natl.Acad.Sci. 86:2453-2457

**Chan,J., Xing,Y., Magliozzo,R.S., Bloom,B.R.** 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated macrophages. J.Exp.Med. 175:1111-1122

**Chaparas,S.D.** 1982. Immunity in tuberculosis. Bull. W.H.O. 60:447-462.

**Chatterjee,D., Roberts,A.D., Lowell,K., Brennan,P.J., Orme,I.M.** 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. Infect.Immun. 60:1249-1253

**Chen,W., Havell,E.A., Harmsen,A.G.** 1992. Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect.Immun.* 60:1279-1284

**Collins,F.M.** 1986. *Mycobacterium avium* complex infections and development of the acquired immunodeficiency syndrome: casual opportunist or causal cofactor? *Int.J.Lepr.* 54:458-474.

**Collins,F.M.** 1988. AIDS-related mycobacterial disease. *Springer Semin.Immunopathol.* 10:375-391

**Collins,F.M.** 1993. Tuberculosis: the return of an old enemy. *Crit.Rev.Microbiol.* 19:1-16

**Cooper,A.M., Dalton,D.K., Stewart,T.A., Griffin,J.P., Russel,D.G., Orme,I.M.** 1993. Disseminated tuberculosis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.* 178:2243-2247.

**Crocker,P.R., Blackwell,J.M., Bradley,D.J.** 1984. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect.Immun.* 43:1033-1040

**Crowle,A.J.** 1990. Intracellular killing of mycobacteria. *Res.Microbiol.* 141:231-236.

**Crowle,A.J., Elkins,N.** 1990. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect.Immun.* 58:632-638.

**Crowle,A.J., Dahl,R., Ross,E., May,M.H.** 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect.Immun.* 59:1823-1831

**Crowle,A.J., Ross,E.J., May,M.H.** 1987. Inhibition by 1.25 (OH)<sup>2</sup>-vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect.Immun.* 55:2945-2950

**Crowle,A.J., Tsang,A.Y., Vatter,A.E., May,M.H.** 1986. Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J.Clin.Microbiol.* 24:812-821.

**Damoiseaux,J.G.M.C., Dopp,E.A., Neefjies,J.J., Beelen,R.H.J., Dijkstra,C.D.** 1989. Heterogeneity of macrophages in the rat evidenced by variability in determinants: two new anti-rat macrophage antibodies against a heterodimer of 160 and 95 kd (CD11/CD18). *J.Leuk.Biol.* 46:556-

**D'Arcy Hart,P., Armstrong,J.A., Brown,C.A., Draper,P.** 1972. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect.Immun.* 5:803-807

**D'Arcy Hart,P., Young,M.R., Gordon,A.H., Sullivan,K.H.** 1987. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J.Exp.Med.* 166:933-946

**D'Arcy Hart,P., Young,M.R., Jordan,M.M., Perkins,W.J., Geisow,M.J.** 1983. Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. *J.Exp.Med.* 158:477-492

**David,H.L.** 1990. The spectrum of tuberculosis and leprosy: what can be the significance of specific humoral responses? *Res.Microbiol.* 141:197-206.

**De Chastellier,C., Berche,P.** 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect.Immun.* 62:543-553

**De Chastellier,C., Fréhel,C., Offredo,C., Skamene,E.** 1993. Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. *Infect.Immun.* 61:3775-3784.

**DeChatelet,L.R., Mullikin,D., McCall,C.E.** 1975. The generation of superoxide anion by various types of phagocyte. *J.Infect.Dis.* 131:443-446

**Denis,M.** 1991a. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium* : killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J.Leuk.Biol.* 49:380-387.

**Denis,M.** 1991b. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *J.Leukoc.Biol.* 50:495-501

**Denis,M.** 1991c. Modulation of *Mycobacterium avium* growth in vivo by cytokines: involvement of tumor necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. *Clin.Exp.Immunol.* 83:466-471.

**Denis,M.** 1991d. Growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. *Eur.J.Immunol.* 21:391-395

**Denis, M.** 1991e. Colony-stimulating factors increase resistance to atypical mycobacteria in resistant mice, whereas they decrease resistance in susceptible strains of mice. *J.Leukoc.Biol.* 50:296-302

**Denis, M.** 1992. Mouse T cell clones against *Mycobacterium avium* : identification of clones that modify resistance against atypical mycobacteria infection. *J.Leuk.Biol.* 51:7-12

**Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Gervais, F., Skamene, E.** 1990. Killing of *Mycobacterium smegmatis* by macrophages from genetically susceptible and resistant mice. *J.Leukoc.Biol.* 47:25-30

**Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Skamene, E.** 1988a. Pleiotropic effects of the *Bcg* gene. I. Antigen presentation in genetically susceptible and resistant congenic mouse strains. *J.Immunol.* 140:2395-2400

**Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Skamene, E.** 1988b. Pleiotropic effects of the *Bcg* gene: III. Respiratory burst in *Bcg*-congenic macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 73:370-375

**Denis, M., Ghadirian, E.** 1993. IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J.Immunol.* 151:5425-5430

**Denis, M., Ghadirian, E.** 1994. Interleukin-1 is involved in mouse resistance to *Mycobacterium avium*. *Infect.Immun.* 62. 457-461

**Denis, M., Gregg, E.O.** 1990. Recombinant tumor necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunol.* 71:139-141.

**Denis, M., Gregg, E.O.** 1991. Modulation of *Mycobacterium avium* growth in murine macrophages: reversal of unresponsiveness to interferon-gamma by indomethacin or interleukin-4. *J.Leukoc.Biol.* 49:65-72

**de Vries, R.R.P., Serjeantson, S.W., Layrisse, Z.** 1984. Leprosy. in Albert, E.D., et al. (eds.). *Histocompatibility Testing*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.362-367.

**D'Império Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T., Eisen, H.** 1985. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur.J.Immunol.* 15:201-203

- Doi,T., Ando,M., Akaike,T., Suga,M., Sato,K., Maeda,H.** 1993. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect.Immun.* 61:1980-1989.
- Dorshkind,K.** 1990. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu.Rev.Immunol.* 8:111-137
- Douvas,G.S., Looker,D.L., Vatter,A.E., Crowle,A.J.** 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and Leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect.Immun.* 50:1-8.
- Drapier,J.-C., Wietzerbin,J., Hibbs,Jr.,J.B.** 1988. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur.J.Immunol.* 18:1587-1592
- Drevets,D.A., Campbell,P.A.** 1991. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect.Immun.* 59:2645-2652
- Drevets,D.A., Leenen,P.J.M., Campbell,P.A.** 1993. Complement receptor type 3 (CD11b/CD18) involvement is essential for killing of *Listeria mognocytogenes* by mouse macrophages. *J.Immunol.* 151:5431-5439.
- Dumarey,C.H., Labrousse,V., Rastogi,N., Vargaftig,B.B., Bachelet,M.** 1994. Selective *Mycobacterium avium*-induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *J.Leuk.Biol.* 56:36-40.
- Ehlers,S., Mielke,M.E.A., Hahn,H.** 1994. Progress in TB research: Robert Koch's dilemma revisited. *Immunol.Today.* 15:1-4
- Eissenberg,L.G., Goldman,W.E., Schlesinger,P.H.** 1993. *Hystoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J.Exp.Med.* 177:1605-1611
- Fattorini,L., Xiao,Y., Santoro,C., Ippoliti,F., Orefici,G.** 1994. Induction of IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, and G-CSF in human macrophages by smooth transparent and smooth opaque colonial variants of *Mycobacterium avium*. *J.Med.Microbiol.* 40:129-133
- Ferrante,A., Martin,A.J., Bates,E.J., Goh,D.H.B., Harvey,D.P., Parsons,D.,**

**Rathjen,D.A., Russ,G., Dayer,J.-M.** 1993. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated neutrophils. *J.Immunol.* 151:4821-4828.

**Ferreira,P., Soares,R., Arala-Chaves,M.** 1991. Susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* is paradoxically correlated with increased synthesis of specific anti-bacterial antibodies. *Int.Immunol.* 3:445-452

**Flesch,I., Kaufmann,S.H.E.** 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon- $\gamma$ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 138:4408-4413

**Flesch,I.E.A., Kaufmann,S.H.E.** 1988. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect.Immun.* 56:1464-1469

**Flesch,I.E.A., Kaufmann,S.H.E.** 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect.Immun.* 58:2675-2677.

**Flesch,I.E.A., Kaufmann,S.H.E.** 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect.Immun.* 59:3213-3218

**Flynn,J.L., Chan,J., Triebold,K.J., Dalton,D.K., Stewart,T.A., Bloom,B.R.** 1993. An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J.Exp.Med.* 178:2249-2254.

**Flynn,J.L., Goldstein,M.M., Chan,J., Triebold,K.J., Pfeffer,K., Lowenstein,C.J., Schreiber,R., Mak,T.W., Bloom,B.R.** 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immun.* 2:561-572

**Flynn,J.L., Goldstein,M.M., Triebold,K.J., Koller,B., Bloom,B.R.** 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 89:12013-12017

**Forman,H.J., Thomas,M.J.** 1986. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Ann.Rev.Physiol.* 48:669-680

**Fortier,A.H., Polsinelli,T., Green,S.J., Nacy,C.A.** 1992. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector molecules.



Infect.Immun. 60:817-825

**Frehel,C., De Chastellier,C., Lang,T., Rastogi,N.** 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. Infect.Immun. 52:252-262

**Frehel,C., Rastogi,N.** 1987. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. Infect.Immun. 55:2916-2921

**Furney,S.K., Skinner,P.S., Roberts,A.D., Appelberg,R., Orme,I.M.** 1992. Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor. Infect.Immun. 60:4410-4413

**Gangadharam,P.R.J., Edwards III,C.K.** 1984. Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. Am.Rev.Respir.Dis. 130:834-838

**Geertsma,M.F., Nibbering,P.H., Pos,O., van Furth,R.** 1990. Interferon- $\gamma$ -activated human granulocytes kill ingested *Mycobacterium fortuitum* more efficiently than normal granulocytes. Eur. J.Immunol. 20:869-873

**Gessani,S., Testa,U., Varano,B., Di Marzio,P., Borghi,P., Conti,L., Barberi,T., Tritarelli,E., Martucci,R., Seripa,D., Peschle,C., Belardelli,F.** 1993. Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. J.Immunol. 151:2758-3766.

**Good,R.C.** 1985. Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. Ann.Rev.Microbiol. 39:347-369.

**Gordon,S., Fraser,I., Nath,D., Hughes,D., Clarke,S.** 1992. Macrophages in tissues and in vitro. Curr.Opin.Immunol. 4:25-32

**Goren,M.B., Brennan,P.J.** 1979. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. *in* Youmans,G.P. (ed.). Tuberculosis. W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp. 63-179.

**Goto,Y., Buschman,E., Skamene,E.** 1989. Regulation of host resistance to *Mycobacterium intracellulare* in vivo and in vitro by the *Bcg* gene. Immunogen. 218-221

**Goto,Y., Nakamura,R.M., Takahashi,H., Tokunaga,T.** 1984. Genetic control of resistance

to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Infect.Immun.* 46:135-140

**Grange,J.M., Yates, M.D.** 1986. Infections caused by opportunist mycobacteria: a review. *J.Royal Soc.Med.* 79:226-229

**Green,S.J., Crawford,R.M., Hockmeyer,J.T., Meltzer,M.S., Nacy,C.A.** 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J.Immunol.* 145:4290-4297

**Greenberg,A.H.** 1989. Role of natural killer cells in inflammation and antibacterial activity. *in* Reynolds,C.W., Wiltout,R.H. (eds.). *Functions of the Natural Immune System.* Plenum Press. pp.185-204

**Griffin,J.P., Harshan,K.V., Born,W.K., Orme,I.M.** 1991. Kinetics of accumulation of  $\gamma\delta$  receptor-bearing T lymphocytes in mice infected with live mycobacteria. *Infect.Immun.* 59:4263-4265.

**Gros,P., Skamene,E., Forget,A.** 1983. Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J.Immunol.* 131:1966-1972.

**Guilbert,L.J., Winkler-Lowen,B., Smith,A., Branch,D.R., Garcia-Lloret,M.** 1993. Analysis of the synergistic stimulation of mouse macrophage proliferation by macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). *J.Leuk.Biol.* 54:65-72

**Hackstadt,T., Williams,J.C.** 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetti*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 78:3240-3244

**Haidaris,C.G., Bonventre,P.F.** 1982. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J.Immunol.* 129:850-855

**Hamilton,J.A., Whitty,G.A., Royston,A.K.M., Cebon,J., Layton,J.E.** 1992. Interleukin-4 suppresses granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in stimulated human monocytes. *Immunol.* 76:566-571

**Harshan,K.V., Gangadharam,P.R.J.** 1991. In vivo depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of *Mycobacterium avium* complex in mice. *Infect.Immun.* 59:2818-2821

**Heinzel,F.P.** 1995. Th1 and Th2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 8:151-155

- Hibbs,J.B.,Jr., Taintor,R.R., Vavrin,Z.** 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 235:473-476
- Hiester,A.A., Metcalf,D.R., Campbell,P.A.** 1992. Interleukin-4 is chemotactic for mouse macrophages. *Cell.Immunol.* 139:72-80.
- Hogan,M.M., Vogel,S.N.** 1988. Macrophage-derived cytokines. *J.Immunol.Immunopharmacol.* VIII:6-15
- Homan-Müller,J.W.T., Weening,R.S., Roos,D.** 1975. Production of hydrogen peroxide by phagocytizing human granulocytes. *J.Lab.Clin.Med.* 85:198-207
- Horsburgh,C.R.** 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N.Engl.J.Med.* 324:1332-1338.
- Horwitz,M.A., Maxfield,F.R.** 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J.Cell Biol.* 99:1936-1943
- Hsieh,C.-S., Macatonia,S.E., Tripp,C.S., Wolf,S.F., O'Garra,A., Murphy,K.M.** 1993. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 260:547-549
- Hubbard,R.D., Collins,F.M.** 1991. Immunomodulation of mouse macrophage killing of *Mycobacterium avium* *in vitro*. *Infect.Immun.* 59:570-574.
- Hubbard,R.D., Flory,C.M., Collins,F.M.** 1992. T-cell immune responses in *Mycobacterium avium*-infected mice. *Infect.Immun.* 60:150-153
- Hughes,H.P.A.** 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol.Today.* 4:340-347
- Inderlied,C.B., Kemper,C.A., Bermudez,L.E.M.** 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin.Microbiol.Rev.* 6:266-310
- Iseman,M.D.** 1989. *Mycobacterium avium* complex and the normal host. *N.Engl.J.Med.* 321:896-898.
- Ishibashi,Y., Arai,T.** 1990. Roles of the complement receptor type 1 (CR1) and type 3 (CR3) on

phagocytosis and subsequent phagosome-lysosome fusion in *Salmonella* -infected murine macrophages  
FEMS Microbiol.Immunol. 64:89-96

**Iyengar,R., Stuehr,D.J., Marletta,M.A.** 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84:6369-6373.

**Izzo,A.A., North,R.J.** 1992. Evidence for an  $\alpha\beta$  T cell-infdependent mechanism of resistance to mycobacteria. Bacillus Calmette-Guerin causes progressive infection in severe combined immunodeficient mice, but not in nude mice or in mice depleted of CD4+ and CD8+ T cells. J.Exp.Med. 176:581-586

**Jackett,P.S., Aber,V.R., Lowrie,D.B.** 1980. The susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* to catalase-mediated peroxidative killing. J.Gen.Microbiol. 121:381-386.

**James,S.L., Glaven,J.** 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. J.Immunol. 143:4208-4212.

**Jones,G.S., Amirault,H.J.,Andersen,B.R.** 1990. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. J.Infect.Dis. 162:700-704

**Kaplan,G., Gandhi,R.R., Weinstein,D.E., Levis,W.R., Patarroyo,M.E., Brennan,P.J., Cohn,Z.A.** 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced supression of T cell proliferation in vitro. J.Immunol. 138:3028-3034

**Kaplan,G., Cohn,Z.A.** 1991. Leprosy and cell-mediated immunity. Curr.Opin.Immunol. 3:91-96

**Kaufmann,S.H.E.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. in Paul,W.E., ed. Fundamental Immunology, Third Edition. Raven Press, Ltd.,New York. pp. 1251-1286

**Kaufmann,S.H.E., Flesch,I.E.A.** 1990. Antimycobacterial functions in bone-marrow-derived macrophages. Res.Microbiol. 141:244-248.

**Kaufmann,S.H.E., Gulle,H., Daugelat,S., Schoel,B.** 1992. Tuberculosis and leprosy: attempts to identify T-cell antigens of potential value for vaccine design. Scand.J.Immunol. 36:85-90.

**Kennedy,C., Lien,R.A.M.C.A., Stolz,E., van Joost,T., Naafs,B.** 1990. Leprosy and human immunodeficiency virus infection. A closer look at the lesions. Int.J.Dermatol. 29:139-140.

**Kincaid,P.W., Gimble,J.M.** 1993. B lymphocytes. *in* Paul,W.E., ed. *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. pp. 43-73

**Kindler,V., Sappino,A.-P., Grau,G.E., Piguet,P.-F., Vassalli,P.** 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 56:731-740

**Klebanoff,S.J.** 1985. Oxygen-dependent antimicrobial systems in mononuclear phagocytes. *in* Reichard,S. e Kojima,M., eds.. *Progress in Leukocyte Biology, Vol.4: Macrophage Biology*. Alan R. Liss, New York p. 487-503

**Kronenberg,M.** 1994. Antigens recognized by  $\gamma\delta$  T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 6:64-71.

**Lagranderie,M., Frehel,C., de Chastellier,C., Gheorghiu,M.** 1991. Cellular oxidative responses and mycobacterial growth inhibition in aerosol and intradermal BCG-immunized guinea-pigs. *Biologicals* 19:335-345.

**Lagrange, P.H.** La lépre. 1987. *Médecine/Sciences.* 3:442-443

**Langermans,J.A.M., van der Hulst,M.E.B., Nibbering,P.H., Hiemstra,P.S., Fransen,L., van Furth,R.** 1992. IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor-necrosis factor- $\alpha$ . *J.Immunol.* 148:568-574

**Lissner,C.R., Swanson,R.N., O'Brien,A.D.** 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium* : expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolates in vitro. *J.Immunol.* 131:3006-3013

**Lloyd,A.R., Oppenheim,J.J.** 1992. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol.Today.* 13:169-172

**Lowrie,D.B.** 1983. Mononuclear phagocyte-mycobacterium interaction. *in* *Biology of Mycobacteria*. Vol. 2. Academic Press London. pp. 235-277.

**Lowrie,D.B., Andrew,P.W.** 1988. Macrophage antimycobacterial mechanisms. *Br.Med.Bull.* 44:624-634.

**Masur,H., and the Public Health Service Task Force on Prophylaxis and Therapy for Mycobacterium avium complex.** 1993. Recommendations on prophylaxis and therapy for

disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N.Engl.J.Med.* 329:898-904.

**Mauël,J., Corradin,S.B., Buchmüller-Rouiller,Y.** 1991. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. Nitric oxide and host defence-39th Forum in Immunology. *Res. Immunol.* 142:577-580

**Mellman,I., Fics,R., Helenius,A.** 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann.Rev.Biochem.* 55:663-700

**Metcalf,D., Elliot,M.J., Nicola, N.A.** 1992. The excess numbers of peritoneal macrophages in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice are generated by local proliferation. *J.Exp.Med.* 175:877-884

**Michelini-Norris,M.B., Blanchard,D.K., Friedman,H., Djeu,J.Y.** 1992. Differential release of interleukin (IL)-1a, IL-1b, and IL-6 from normal human monocytes stimulated with a virulent and an avirulent isogenic variant of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *J.Leukoc.Biol.* 50:529-538

**Moehring,J.M., Solotorovsky,M.R.** 1965. Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the nonphotochromogens. *Am.Rev.Resp.Dis.* 92:704-713.

**Modlin,R.L., Nutman,T.B.** 1993. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr.Opin.Immunol.* 5:511-517

**Mombaerts,P., Arnoldi,J., Russ,F., Tonegawa,S., Kaufmann,S.H.E.** 1993. Differential roles of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature.* 365:53-56.

**Moore,K.W., O'Garra,A., de Waal-Malefyt,R., Vieira,P., Mosmann,T.R.** 1993. Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol.* 11:165-190.

**Moreno,C., Mehlert,A., Lamb,J.** 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin.Exp.Immunol.* 74:206-210

**Moreno,C., Taverne,J., Mehlert,A., Bate,C.A.W., Brealey,R.J., Meager,A., Rook,G.A.W., Playfair,J.H.L.** 1989. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages.

Clin.Exp.Immunol. 76:240-245

**Murray,H.W.** 1981. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. J.Exp.Med. 153:1302-1315

**Murray,H.W., Rubin,B.Y., Carriero,S.M., Harris,A.M., Jaffee,E.A.** 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J.Immunol. 134:1982-1988

**Mutis,T., Kraakman,E.M., Cornelisse,Y.E., Haanen,J.B.A.G., Spits,H., De Vries, R.R.P., Ottenhoff,T.H.M.** 1993. Analysis of cytokine production by Mycobacterium-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. J.Immunol. 150:4641-4651.

**Nacy,C.A., Green,S.J., Laiby,D.L., Nelson,B.A., Crawford,R.M., Fortier,A.H., Hoover,D.L., Meltzer,M.S.** 1990. Intercellular communication: macrophages and cytokines. In Kiyono,H., Jirillo,E., DeSimone,C. (eds.). Molecular Aspects of Immune Response and Infectious Diseases. Raven Press,Ltd., New York. pp: 47-53

**Nathan,C., Nogueira,N., Juangbhanich,C., Ellis,J., Cohn,Z.** 1979. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. J.Exp.Med. 149:1056-1068

**Neill,M.A., Klebanoff,S.J.**1988. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages.J.Exp.Med. 167:30-42

**Neville,K., Bromberg,A., Bromberg,R., Bonk,S., Hanna,B.A., Rom,W.N.** 1994. The third epidemic - multidrug-resistant tuberculosis. Chest.105:45-48

**Nibbering,P.H., Pos,O., Stevenhagen,A., van Furth,R.** 1993. Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. Infect.Immun. 61:3111-3116.

**Nibbering,P.H., Yoshida,S.-I., van den Barselaar,M.T., van Furth,R.** 1994. Bacteriostatic activity of BCG/PPD-activated macrophages against *Mycobacterium fortuitum* does not involve reactive nitrogen or oxygen intermediates. Scand.J.Immunol. 40:187-194.

**Noordeen,S.K.** 1991. Leprosy control though multidrug therapy (MDT). Bull.W.H.O. 69:263-269.

- Norris,K.A., Schrimpf,J.E., Flynn,J.L., Morris,S.M.,Jr.** 1995. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.* 63:2793-2796
- Ohmori,Y., Wyner,L., Narumi,S., Armstrong,D., Stoler,M., Hamilton,T.A.** 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am.J.Pathol.* 142:861-870
- Orme,I.M.** 1993. The role in CD8+ T cells in immunity to tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 1:77-78.
- Orme,I.M., Andersen,P., Boom,W.H.** 1993. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infect.Dis.* 167:1481-97.
- Orme,I.M., Stokes,R.W., Collins,F.M.** 1986. Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. *J.Immunol.* 54:56-62
- Pattyn,S.R., Hermans-Boveroulle,M.T.** 1970. Dissociation in *M. avium*. *Pneumology.* 142:119-125.
- Payne,N.R., Horwitz,M.A.** 1987. Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J.Exp.Med.* 166:1377-1389
- Pedrosa,J., Flórido,M., Kunze,Z.M., Castro,A.G., Portaels,F., McFadden,J., Silva,M.T., Appelberg,R.** 1994. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin.Exp.Immunol.* 98:210-216.
- Peloquin,C.A.** 1993a. Mycobacterial infections. *Pharmacother.*13:634-639
- Peloquin,C.A.** 1993b. Controversies in the management of *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS patients. *Ann.Pharmacother.* 27:928-937.
- Peloquin,C.A., Berning,S.E.** 1994. Infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann.Pharmacother.*28:72-83
- Perussia,B., Kobayashi,M., Rossi,M.E., Anegon,I., Trinchieri,G.** 1987. Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.



J.Immunol. 138:765-774.

**Pitchenik,A.E., Fertel,D.** 1992. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease. Med.Clin.North Am. 76:121-171

**Plant,J.E., Glynn,A.A.** 1976. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. J.Infect. Dis. 133:72-78.

**Potter,M., O'Brien,A.D., Skamene,E., Gros,P., Forget,A., Kongshavn,P.A.L., Wax,J.S.** 1983. A BALB/c congenic strain of mice that carries a genetic locus (*Ity<sup>r</sup>*) controlling resistance to intracellular parasites. Infect.Immun. 40:1234-1235

**Pourshafie,M., Ayub,Q., Barrow,W.W.** 1993. Comparative effects of *Mycobacterium avium* glycopeptidolipid and lipopeptide fragment on the function and ultrastructure of mononuclear cells. Clin.Exp.Immunol. 93:72-79

**Prinzis,S., Rivoire,B., Brennan,P.J.** 1994. Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*. Infect.Immun. 62:1946-1951.

**Rastogi,N.** 1990. Killing intracellular mycobacteria in in vitro macrophage systems: What may be the role of known host microbicidal mechanisms? Res.Microbiol. 141:217-230.

**Ridley,D.S., Jopling,W.K.** 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int.J.Lepr. 34:255-273.

**Rockett,K.A., Awburn,M.M., Cowden,W.B., Clark,I.A.** 1991. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. Infect.Immun. 59:3280-3283.

**Rom,W.N., Zhang,Y.** 1993. The rising tide of tuberculosis and the human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. J.Lab.Clin.Med. 121:737-741

**Romagnani,S.** 1991. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunol. Today. 12:256-257.

**Rook,G.A.W., Steele,J., Ainswoth,M., Champion,B.R.** 1986a. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* : comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages Immunol. 59:333-338

**Rook,G.A.W., Steele,J., Fraher,L., Berker,S., Karmali,R., O'Riordan,J.,**

**Stanford,J.** 1986b. Vitamin D3, gamma-interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunol.* 57:159-163

**Rook,G.A.W., Taverne,J., Leveton,C., Steele,J.** 1987. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol.* 62:229-234

**Rothe,J., Lesslauer,W., Lötscher,H., Lang,Y., Koebel,P., Köntgen,F., Althage,A., Zinkernagel,R., Steinmetz,M., Bluethmann,H.** 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 364:798-802

**Rutherford,M.S., Witsell,A., Schook,L.B.** 1993. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J.Leuk.Biol.* 53:602-618.

**Saito,H., Tomioka,H.** 1990. The role of macrophages in host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Res.Microbiol.* 141:206-212.

**Sasada,M., Johnston,R.B.,Jr.** 1980. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *J.Exp.Med.* 152:85-98

**Saunders,B.M., Zhan,Y., Cheers,C.** 1995. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance of mice to *Mycobacterium avium* complex infection. *Infect.Immun.* 63:4011-4015

**Schaefer,W.B., Davis,C.L., Cohn,M.L.** 1970. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am.Rev.Resp.Dis.* 102:499-506.

**Schlesinger,L.S.** 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J.Immunol.* 150:2920-2930.

**Schlesinger,L.S., Bellinger-Kawahara,C.G., Payne,N.R., Horwitz,M.A.** 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3 in serum. *J.Immunol.* 144:2771-2780

**Schlesinger,L.S., Horwitz,M.A.** 1991. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN- $\gamma$  activation inhibits complement receptor function

and phagocytosis of this bacterium. *J.Immunol.* 147:1983-1994

**Schrier,D.J., Sternick,J.L., Allen,E.M., Moore,V.L.** 1982. Immunogenetics of BCG-induced anergy in mice: control by genes linked to the *Igh* complex. *J.Immunol.* 128:1466-1469

**Segal,A.W., Geisow,M., Garcia,R., Harper,A., Miller,R.** 1981. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature.* 290:406-409

**Shiratsuchi,H., Johnson,J.L., Toba,H., Ellner,J.J.** 1990. Strain- and donor-related differences in the interaction of *Mycobacterium avium* with human monocytes and its modulation by interferon- $\gamma$ . *J.Infect.Dis.* 162:932-938.

**Shiratsuchi,H., Toosi,Z., Mettler,M.A., Ellner,J.J.** 1993. Colonial morphotype as a determinant of cytokine expression by human monocytes infected with *Mycobacterium avium*. *J.Immunol.* 150:1945-1954

**Sibley,L.D., Franzblau,S.G., Krahenbuhl,J.L.** 1987. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect.Immun.* 55:680-685

**Sibley,L.D., Hunter,S.W., Brennan,P.J., Krahenbuhl,J.L.** 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect.Immun.* 56:1232-1236

**Sibley,L.D., Weidner,E., Krahenbuhl,J.L.** 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 315:416-419

**Sieling,P.A., Wang,X.-O., Gately,M.K., Oliveros,J.L., McHugh,T., Barnes,P.F., Wolf,S.F., Golkar,L., Yamamura,M., Yogi,Y., Uyemura,K., Rea,T., Modlin,R.L.** 1994. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J.Immunol.* 153:3639-3647

**Silva,M.T., Silva,M.N.T., Appelberg,R.** 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb.Pathogen.* 6:369-380

**Snider,Jr.,D.E.** 1989. Introduction. *Rev.Infect.Dis.* 11:S336-S338.

**Sone,S., Yanagawa,H., Nishioka,Y., Orino,E., Bhaskaran,G., Nii,A., Mizuno,K., Heike,Y., Ogushi,F., Ogura,T.** 1992. Interleukin-4 as a potent down-regulator for human alveolar macrophages capable of producing tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1. *Eur.Resp.J.*

5:174-181

**Sprent, J.** 1993. T lymphocytes and the thymus. *in* Paul, W.E., ed. *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. pp. 75-109

**Stach, J.-L., Gros, P., Forget, A., Skamene, E.** 1984. Phenotypic expression of genetically-controlled natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J.Immunol.* 132:888-892

**Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 258:1898-1902

**Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S.** 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J.Exp.Med.* 176:287-292

**Stevens, D.L.** 1995. Cytokines: an updated compendium. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 8:175-180

**Stokes, R.W., Collins, F.M.** 1990. Passive transfer of immunity to *Mycobacterium avium* in susceptible and resistant strains of mice. *Clin.Exp.Immunol.* 81:109-115

**Stokes, R.W., Orme, I.M., Collins, F.M.** 1986. Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. *Infect.Immun.* 54:811-819

**Suzuki, K., Lee, W.J., Hashimoto, T., Tanaka, E., Murayama, T., Amitani, R.** 1994. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or tumor necrosis factor- $\alpha$  activate human alveolar macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium* complex. *Clin.Exp.Immunol.* 98:169-173.

**Swartz, R.P., Naai, D., Vogel, C.-W., Yeager Jr, H.** 1988. Differences in uptake of mycobacteria by human monocytes: a role for complement. *Infect.Immun.* 56:2223-2227

**Sypek, J.P., Jacobson, S., Vorys, A., Wyler, D.J.** 1993. Comparison of gamma interferon, tumor necrosis factor, and direct cell contact in activation of antimycobacterial defense in murine macrophages. *Infect.Immun.* 61:3901-3906.

**Tachibana, K., Chen, G., Huang, D.S., Scuderi, P., Watson, R.R.** 1992. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by resident and activated murine macrophages. *J.Leuk.Biol.* 51:251-255

**Talaro,K., Talaro,A.** 1993. The nature of host defenses. in "Foundations in Microbiology", Wm.C. Brown Publishers. pp. 361-392

**Tassell,S.K., Pourshafie,M., Wright,E.L., Richmond,M.G., Barrow,W.W.** 1992. Modified lymphocyte response to mitogens induced by the lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect.Immun.* 60:706-711

**Terstappen,L.W.M.M., Nguyen,M., Lazarus,H.M., Medof,M.E.** 1992. Expression of the DAF (CD55) and CD59 antigens during normal hematopoietic cell differentiation. *J.Leuk.Biol.* 52:652-660.

**Te Velde,A.A., Kolmp,J.P.G., Yard,B.A., De Vries,J.E., Figdor,C.G.** 1988. Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4. *J.Immunol.* 140:1548-1554

**Tite,J.P., Dougan,G., Chatfield,S.N.** 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J.Immunol.* 147:3161-3164

**Toba,H., Crawford,J.T., Ellner,J.J.** 1989. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma-interferon. *Infect.Immun.* 57:239-244

**Tomioka,H., Saito,H.** 1993. Macrophage chemiluminescence induced by interaction with transparent and opaque colonial variants of *Mycobacterium intracellulare*. *J.Gen.Microbiol.* 139:3011-3015

**Tracey,K.J., Cerami,A.** 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Ann.Rev.Cell Biol.* 9:317-343

**Tripp,C.S., Wolf,S.F., Unanue,E.R.** 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  are costimulators of interferon  $\gamma$  production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90:3725-3729

**van der Meer,J.W.M., Vogels,M.T.E.** 1991. Interleukin-1 as a therapeutic agent in serious infections? in *Bacterial Endotoxins: cytokine mediators and new therapies for sepsis*. Wiley-Liss,Inc. pp.197-206.

**van Dissel,J.T., Stikkelbroeck,J.J.M., van den Barcelaar,M.T., Sluiter,W.,**

- Leijh,P.C.J., van Furth,R.** 1987. Divergent changes in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 139:1665-1672
- van Furth,R.** 1990. Mycobacteria and macrophage activation. *Res.Microbiol.* 141:256-261.
- Van Snick,J.** 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* 8:253-278
- Vidal,S.M., Malo,D., Vogan,K., Skamene,E., Gros,P.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 73:469-485.
- Wadee,A.A.** 1990. A 25-kDa fraction from *Mycobacterium tuberculosis* that inhibits leukocyte bactericidal activity: reversal by gamma interferon and clofazimine. *Res.Microbiol.* 141:249-252.
- Wadee,A.A., Clara,A.M.** 1989. A 25-kilodalton fraction from *Mycobacterium tuberculosis* that inhibits hexose monophosphate shunt activity, lysozyme release, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production: reversal by gamma interferon. *Infect.Immun.* 57:864-869
- Walker,L., Lowrie,D.B.** 1981. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. *Nature.* 293:69-70
- Wallis,R.S., Amir-Tahmasseb,M., Ellner,J.J.** 1990. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte western blot. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 87:3348-3352
- Wanidworanun,C., Strober,W.** 1993. Predominant role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human monocyte IL-10 synthesis. *J.Immunol.* 151:6853-6861.
- Wardle,E.N.** 1993. Cytokines: an overview. *Eur.J.Med.* 2:417-423.
- Watanabe,K., Kagaya,K., Yamada,T., Fukazawa,Y.** 1991. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect.Immun.* 59:521-528
- Wayne,L.G.** 1985. The "atypical" mycobacteria: recognition and disease association. *Crit.Rev.Microbiol.* 12:185-222.
- Wewers,M.D., Herzyk,D.J.** 1989. Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1 release. *J.Immunol.* 143:1635-1641
- Wherry,J.C., Schreiber,R.D., Unanue,E.R.** 1991. Regulation of gamma interferon

production by natural killer cells in scid mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect.Immun.* 59:1709-1715

**Wolinsky,E.** 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am.Rev.Resp.Dis.* 119:107-159.

**Wolinsky,E.** 1992. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin.Infect.Dis.* 15:1-12

**Wright,S.D., Silverstein,S.C.** 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J.Exp.Med.* 158:2016-2023

**Wu,G., Brosnan,J.T.** 1992. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem.J.* 281:45-48

**Wu,J., Ogle,C., Alexander,J.W.** 1989. The heterogeneity of Kupffer cell and alveolar, peritoneal, and splenic macrophages in PGE2 and TxB2 production. *J.Leuk.Biol.* 46:321

**Xu,D.L., Goto,Y., Amoako,K.K., Nagatomo,T., Uchida,K., Shinjo,T.** 1995. Immune responsiveness in *Mycobacterium avium*-infected mice: changes in the proportion of T cell subsets and antibody production during the course of infection. *Clin.Exp.Immunol.* 102:523-528

**Yoder,L.J.** 1993. Epidemiology and treatment of leprosy. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 6:349-354.

**Young,L.S.** 1988a. *Mycobacterium avium* complex infection. *J.Infect.Dis.* 157:863-867.

**Young,D.B.** 1988b. Structure of mycobacterial antigens. *Br.Med.Bull.* 44:562-583.

**Young,D.B., Mehlert,A.** 1989. Serology of mycobacteria: characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. *Rev.Infect.Dis.* 11:S431-S435.

oferta 97 17 18  
3.000\$00

BIBLIOTECA  
do  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
"ABEL SALAZAR"