

Maria Salomé Custódio Gomes

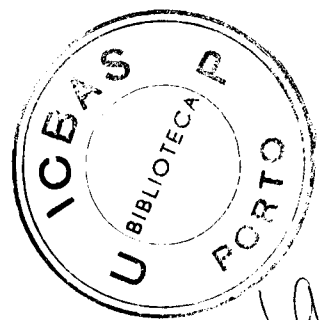
**A interacção entre o macrófago e o
*Mycobacterium avium***



Universidade do Porto

1999

W4
GOM *[Signature]* RTA



86/9

Maria Salomé Custódio Gomes

**A interacção entre o macrófago e o
*Mycobacterium avium***

Dissertação para obtenção do grau de Doutor,
apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar, Universidade do Porto
Orientador: prof. Doutor Rui Appelberg Gaio Lima

1999

Aos meus pais
Ao Paulo

Agradecimentos

"Contar os dias pelos dedos e encontrar a mão cheia"*

Todas as pessoas a seguir mencionadas e certamente muitas outras que por lapso ou por contenção omito, contribuíram não só para tornar este trabalho possível, mas também para que os últimos quatro anos tenham sido para mim plenos de experiências, descobertas, avanços, muito para além dos de carácter científico, que aqui ficam registados.

O prof. Rui Appelberg aceitou o risco de ser o meu orientador de doutoramento. Será escusado dizer que é a ele que devo tudo o que realizei. Se não é muito, é por defeito meu. O Rui ensinou-me a trabalhar com macrófagos e, inevitavelmente, a apaixonar-me por macrófagos. De resto, partilhou sempre conosco as suas paixões e ódios de estimação. Criou um grupo unido por laços de amizade e cumplicidade muito fortes, onde se trabalha com muito prazer e muito entusiasmo. Acima de tudo, o Rui constituiu um exemplo que eu procurei seguir, como aprendiz de investigadora e é isso que eu mais lhe agradeço.

O prof. Manuel Teixeira da Silva abriu-me as portas do seu laboratório no Centro de Citologia Experimental com uma generosidade e confiança pelas quais lhe serei sempre muito grata. Deu-me também em várias ocasiões apoio técnico e científico muito importante para a execução dos trabalhos descritos nesta tese.

O prof. Manuel Teixeira da Silva, o prof. Artur Águas e o prof. Alexandre Quintanilha aceitaram fazer parte da Comissão de Acompanhamento do meu processo de candidatura ao grau de Doutor,

mostrando toda a disponibilidade para apoiar a prossecução dos trabalhos.

A prof. Gilla Kaplan, da Universidade Rockefeller de Nova Iorque, abriu-me as portas de um laboratório de referência na história do estudo do macrófago. Proporcionou-me um ambiente de trabalho, quer físico quer intelectual, que mudou a minha forma de encarar a Ciência. Partilhou também comigo a sua visão do Mundo, que é uma das mais abrangentes que alguém pode ter.

O prof. Michel Rabinovitch contribuiu de forma fundamental para a evolução da minha forma de encarar os problemas científicos. Poucas pessoas são capazes como ele de discussões estimulantes, em que a curiosidade, a criatividade, o sonho mesmo, se aliam a um sentido crítico agudíssimo e a uma grande sabedoria.

Todos os elementos do grupo de trabalho de Gilla Kaplan, em especial o Simon Paul e o André Moreira, contribuíram generosamente para tornar agradável a minha estadia naquele laboratório.

O Doutor Johan Boelaert do Hospital Sint Jan de Brugge partilhou comigo os seus vastíssimos conhecimentos e incentivou-me a pensar no ferro como um factor chave na problemática que me propus estudar, durante os trabalhos de preparação desta tese. Proporcionou-me também o contacto com várias pessoas com quem muito aprendi.

A prof. Carole Beaumont, da Faculdade de Medicina Xavier Bichat em Paris acolheu-me no seu laboratório com a maior generosidade, partilhando conhecimentos que foram muito importantes para mim e abriram novos caminhos no desenrolar deste trabalho.

O prof. João Carlos Figueiredo de Sousa, o prof. Miguel Cabral e a prof. Maria de S. José Nascimento, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, deram-me a primeira oportunidade de entrar em

contacto com a investigação na área da Microbiologia e Imunologia da Infecção.

Todos os meus colegas do grupo de Microbiologia e Imunologia da Infecção são amigos preciosos, que me ensinaram muito e me proporcionaram um ambiente de trabalho o mais agradável possível. Todo o trabalho descrito nesta tese é também de todos eles. Venha o próximo!

O António Gil Castro e a Amélia Sarmento, com quem tive o privilégio de partilhar o laboratório durante algum tempo, foram também, para além de amigos, ajudas pacientes e muito importantes para os meus primeiros passos.

A D. Paula Macedo e a D. Irene Barros prestaram ajuda fundamental em momentos-chave.

A Rosinha e a Olímpia foram incansáveis e exemplares no comprometimento com o bom funcionamento do laboratório.

A minha irmã Carla deu-me sempre apoio e incentivo e ajudou-me a dar a forma final a esta tese.

A JNICT/FCT proporcionou-me o financiamento individual indispensável para que eu pudesse dedicar-me 100% a esta tarefa durante 4 anos.

A todos o meu muito obrigada!

* José Saramago, nos Cadernos de Lanzarote

Abreviaturas	1
Resumo	3
Abstract	7
Resumé	10
Primeira Parte- Introdução	
<u>Capítulo I-</u> O género <i>Mycobacterium</i>	
1. Importância clínica	13
2. Biologia	19
<u>Capítulo II-</u> <i>M. avium</i> : patogénese e imunologia da infecção	
1. No Homem	25
2. No ratinho	30
Segunda Parte- Definição de objectivos	
<u>Capítulo III-</u> Mecanismos anti-microbianos do macrófago	35
1. A fagocitose e a maturação do fagossoma	36
2. Produção de espécies reactivas de oxigénio e azoto	44
3. Retenção de ferro e degradação do triptofano	50
5. O gene <i>Nramp1</i>	56
<u>Capítulo IV-</u> Objectivos e estratégias do presente estudo	60
Terceira Parte- Novos achados	
<u>Capítulo V-1.</u> "Survival of <i>Mycobacterium avium</i> and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in acidified vacuoles of murine macrophages" 1999 Infection & Immunity Aceite para publicação.	63
<u>Capítulo V- 2.</u> "O efeito micobacteriostático do IFN γ não depende de um aumento de acidificação do fagossoma que contém o <i>Mycobacterium avium</i> . Dados não publicados.	95
<u>Capítulo VI-</u> "Improved clearance of <i>Mycobacterium avium</i> upon disruption of the iNOS gene". The Journal of Immunology 1999, vol. 162, p. 6734-6739.	101
<u>Capítulo VII-</u> "Effects of iron deprivation on <i>Mycobacterium avium</i> growth. Tubercle & Lung Disease, 1999. Aceite para publicação.	109
<u>Capítulo VIII-</u> "Evidence for a link between iron metabolism and <i>Nramp1</i> gene function in innate resistance against <i>Mycobacterium avium</i> . Immunology, 1998, vol. 95, p. 165-168.	135
Quarta Parte- Discussão	
<u>Capítulo IX-</u> Discussão	141
Referências	153

Abreviaturas

BMMØ	Bone Marrow-derived Macrophages (macrófagos derivados da medula óssea)
CD	Cluster of Differentiation
CR	Receptor do Complemento
DFO	Desferroxamina, quelante do ferro
EUA	Estados Unidos da América
FcR	Receptor do fragmento Fc das imunoglobulinas
GPL	Glicofosfolípidos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRE	Hypoxia Responsive Element (elemento sensível à hipóxia)
IFN γ	Interferão gama
IL	Interleuquina
IRP	Iron Regulatory Protein (proteína reguladora do ferro)
IRE	Iron Responsive Element (elemento sensível ao ferro)
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LPS	Lipopolissacárido
MAC	Complexo do <i>Mycobacterium avium</i> e <i>M. intracellulare</i>
MBP	Mannose Binding Protein, proteína sérica que se liga à manose
MPO	Mieloperoxidase
NO	Monóxido de Azoto
iNOS	Sintase do Monóxido de Azoto Indutível
NK	Natural Killer
NMMA	N ^G -monometil-L-arginina, inibidor da iNOS
NRAMP	Natural Resistance Associated Macrophage Protein (proteína macrofágica associada à resistência inata)
PIM	Poli-Inositol-Manosídeos
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency (imunodeficiência grave combinada)
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SmD	Smooth Domed, liso e opaco
SmT	Smooth Transparent, liso e transparente
TNF α	Factor de Necrose Tumoral alfa

Resumo

O *Mycobacterium avium* é uma micobactéria que pode ser encontrada no ambiente e é frequentemente isolada das águas de consumo. Não causa doença em indivíduos imunocompetentes, mas é uma das mais frequentes infecções bacterianas oportunistas dos doentes com SIDA.

O *M. avium* encontra-se no hospedeiro infectado exclusivamente no interior de macrófagos, apesar de os macrófagos serem células vocacionadas para a defesa do organismo em relação a infecções. Para isso, estes fagócitos dispõem de várias armas: receptores de superfície que lhes permitem identificar partículas estranhas, capacidade de ingerir essas partículas, mecanismos de destruição intracelular, nomeadamente produção de espécies reactivas de oxigénio e azoto, assim como enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomas. Possuem ainda mecanismos para limitar o acesso de microrganismos intracelulares ao ferro e ao triptofano. A velocidade de crescimento do *M. avium* no interior do macrófago de ratinho é dependente de características genéticas da célula hospedeira, nomeadamente o gene *Nramp1* e dos efeitos de citocinas produzidas por outras células do sistema imune, nomeadamente IFN γ e TNF α . Não se sabe qual é o mecanismo pelo qual a proteína codificada pelo gene *Nramp1* confere resistência à infecção pelo *M. avium*. O IFN γ e o TNF α são capazes de activar alguns dos mecanismos antimicrobianos do macrófago descritos acima, mas não se sabe quais deles têm um papel importante no controlo do crescimento intramacrofágico do *M. avium*.

O objectivo deste trabalho foi o de entender quais dos potenciais mecanismos antimicrobianos do macrófago são de facto relevantes para determinar o crescimento intramacrofágico do *M. avium* no modelo

murino. Assim, procurámos saber: se a inibição da acidificação e fusão dos fagossomas é um mecanismo fundamental para a sobrevivência do *M. avium* no interior do macrófago; se o efeito micobacteriostático do IFN γ depende de um aumento da acidificação dos fagossomas; qual é o papel do monóxido de azoto (NO) e do acesso ao ferro na sobrevivência e proliferação do *M. avium* no ratinho e se a acção da proteína codificada pelo gene de resistência *Nramp1* está relacionada com o transporte de ferro.

Para atingir esse objectivo, procedemos quer à infecção de macrófagos isolados *in vitro*, quer à infecção de ratinhos, *in vivo*. Em macrófagos derivados da medula óssea (BMM \emptyset) de ratinho, induzimos a transferência de *M. avium* para vacúolos semelhantes a fagolisossomas e avaliámos a sua capacidade de sobreviver e proliferar neste tipo de compartimento. Comparámos o pH dos fagossomas que contêm o *M. avium* em BMM \emptyset não tratados e tratados com IFN γ e TNF α . Comparámos o efeito destas mesmas citoquinas no crescimento intracelular do *M. avium* em macrófagos normais e macrófagos incapazes de produzir monóxido de azoto de forma indutível (iNOS $^{-/-}$). Comparámos o crescimento *in vivo* do *M. avium* em ratinhos normais com o crescimento em ratinhos iNOS $^{-/-}$. Medimos o efeito da adição de quelantes de ferro no crescimento intramacrofágico do *M. avium* em BMM \emptyset , assim como o efeito de uma alimentação pobre em ferro no crescimento da bactéria *in vivo*. Avaliámos de que forma a indução de sobrecarga de ferro nos tecidos afectou o crescimento do *M. avium* *in vivo*, em ratinhos que expressam o alelo resistente ou o alelo susceptível do gene *Nramp1*.

As conclusões gerais a que chegámos foram as seguintes:

1. O *M. avium* consegue sobreviver no interior do macrófago em vacúolos acídicos.

2. A restrição de crescimento intramacrofágico do *M. avium*, induzida pelo tratamento com IFN γ e TNF α , é independente quer da acidificação do fagossoma, quer da produção de radicais de azoto.

3. As espécies reactivas de azoto produzidas durante a infecção por *M. avium* no ratinho, têm um efeito negativo sobre a capacidade do hospedeiro conter a infecção.

4. O crescimento do *M. avium* quer in vivo, quer in vitro, é dependente da disponibilidade de ferro.

5. A vantagem dos ratinhos *Nramp1^r* sobre os *Nramp1^s* no controlo do crescimento do *M. avium* in vivo é contrariada pelo excesso de ferro nos tecidos.

De forma geral, estes resultados indicam que o *M. avium* é resistente à maior parte dos mecanismos antimicrobianos conhecidos do macrófago. O facto de o *M. avium* ser uma espécie de micobactéria geralmente não patogénica indica que haverá mecanismos ainda não conhecidos, que permitem ao macrófago controlar o seu crescimento. Esses mecanismos poderão depender do contacto directo dos macrófagos com outras células do sistema imune. Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a importância da expressão da proteína NRAMP1 funcional no controlo do crescimento do *M. avium* e sugerem fortemente que a sua função passa pela restrição do acesso da bactéria ao ferro. Confirma-se também a importância do desenvolvimento de uma resposta linfocitária T capaz de activar os macrófagos para aumentar a sua capacidade antimicrobiana e revela-se o efeito nocivo que o monóxido de azoto exerce sobre essas células T. Assim, emergem destes resultados as sugestões de que o tratamento dos indivíduos infectados por *M. avium*, deverá incluir agentes que diminuam a quantidade de ferro presente nos tecidos e em particular no interior dos macrófagos e ainda agentes que impeçam a acção tóxica do monóxido de azoto sobre

as células T, de forma a aumentar a sobrevivência e recrutamento destas células para os locais de infecção.

Abstract

Mycobacterium avium is an environmental mycobacterium, often isolated from drinking water. While it does not cause disease in normal individuals, it is one of the most frequent agents of opportunistic infections in AIDS patients.

In the host, *M. avium* is found exclusively inside macrophages, despite the fact that these are cells committed to the defense against infections. Macrophages are equipped with several mechanisms to fight microorganisms: receptors that recognize foreign particles, phagocytic capacity, intracellular microbicidal mechanisms, including the production of oxygen and nitrogen reactive species and lysosomal hydrolytical enzymes. Macrophages are also able to withhold nutrients, notably iron and tryptophan, from intracellular microorganisms. The growth of *M. avium* inside murine macrophages depends both on genetic factors, namely *Nramp1* and on the effects of cytokines produced by other immune cells, like IFN γ and TNF α . The mechanism by which the *Nramp1*-encoded protein confers resistance against infection is not known. IFN γ and TNF α activate several antimicrobial mechanisms in the macrophage but it is not known which of these mechanisms play a role in the control of *M. avium* intramacrophagic growth.

The aim of the present work was to understand which of the potential antimicrobial mechanisms of the macrophage are in fact relevant in arresting the growth of *M. avium* in the murine model. We therefore asked: if the inhibition of acidification and fusion of the *M. avium*-containing phagosomes is a fundamental mechanism for the bacterial survival inside macrophages; if the mycobacteriostatic effect of IFN γ + TNF α depends on an increase in the acidification of the

phagosomes; what are the roles of nitric oxide (NO) production and iron availability in the survival and growth of *M. avium* in the mouse and if there is a link between *Nramp1* gene function and iron metabolism.

To answer these questions, we performed both in vitro infections of isolated macrophages and in vivo infections. We induced the transfer of *M. avium* to phagolysosome-like compartments in bone marrow derived murine macrophages (BMMØ) and evaluated the capacity of the bacterium to survive and multiply in this new compartment. We compared the pH of the phagosomes that contain *M. avium* inside non-activated BMMØ and inside IFN γ +TNF α - activated BMMØ. We compared the effect of the same cytokines on the intracellular growth of *M. avium*, in normal macrophages and macrophages rendered incapable of inducible production of nitric oxide (iNOS $^{-/-}$). We compared the in vivo growth of *M. avium* in normal mice versus iNOS $^{-/-}$ mice. We measured the effect of iron chelators on the growth of *M. avium* inside BMMØ, as well as the effect of a low iron diet on the bacterial growth in vivo. We evaluated the effect of iron overload in the growth of *M. avium* in vivo in mice expressing the resistance or the susceptibility allele of *Nramp1*.

We reached the following conclusions:

- 1- *M. avium* survives inside macrophagic acidic vacuoles.
- 2- The growth inhibition induced by IFN γ and TNF α in the macrophage does not depend on increased acidification of the mycobacterium-containing phagosome, nor on the production of nitric oxide.
- 3- Nitric oxide produced during *M. avium* infection in the mouse has a negative effect on the capacity of the host to control the infection.
- 4- *M. avium* growth depends on iron availability both in vivo and in vitro.

5- The advantage of *Nramp1^F* mice over *Nramp1^S* mice in resistance against *M. avium* infection is overcome by iron overload.

Taken together, these results indicate that *M. avium* is highly resistant against most known antimicrobial mechanisms of the macrophage. The fact that *M. avium* does not usually cause disease suggests that there are still unknown mechanisms by which the macrophage can control its growth. These mechanisms may be dependent on direct contact between the macrophage and other cells of the immune system. The results presented herein confirm the importance of a functional NRAMP1 protein in the control of the *M. avium* infection and strongly suggest that the role of that protein is to restrict the access of the bacterium to iron. They also confirm the importance of the development of a specific T cell response to aid the macrophage cope with the infection and a negative role for NO in this respect is revealed. We thus suggest that the therapy against *M. avium* should include both iron restriction and the inhibition of the activity of nitric oxide.

Résumé

Mycobacterium avium est une mycobactérie environnementale, le plus souvent isolée dans l'eau potable. Cette bactérie est très rarement pathogène chez l'individu normal, alors qu'elle est une des causes les plus fréquentes d'infection opportuniste chez le patient atteint de SIDA.

Dans l'hôte, *M. avium* se retrouve uniquement dans le macrophage, bien que ce type de cellules se charge de la défense anti-infectieuse. Les macrophages sont équipés de différents moyens dans le combat anti-infectieux: des récepteurs qui reconnaissent la particule étrangère, une capacité phagocytaire, et des mécanismes de bactéricidie intracellulaire qui incluent la production de dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote ainsi que les enzymes lytiques lysosomiales. Par ailleurs, les macrophages ont les moyens de dépriver le microorganisme intracellulaire de nutriments tels que le fer et le tryptophane. La croissance de *M. avium* à l'intérieur du macrophage murin est sous la dépendance d'une part de facteurs génétiques tels *Nrampl* et d'autre part de l'effet des cytokines produites par d'autres cellules immunitaires, telles l'IFN γ et le TNF α . Le mécanisme par lequel la protéine codée par *Nrampl* confère une résistance à l'infection reste inconnu. Tant l'IFN γ que le TNF α activent plusieurs mécanismes antimicrobiens à l'intérieur du macrophage, mais l'on ne sait pas lequel de ces mécanismes contrôle la croissance intramacrophagique de *M. avium*.

Le but du présent travail est d'essayer de comprendre lequel de ces mécanismes potentiels de défense antimicrobienne du macrophage est important dans le contrôle de la croissance de *M. avium* dans un modèle murin. Nous nous sommes posé les questions suivantes: si d'une part la survie de *M. avium* à l'intérieur du macrophage est liée à l'inhibition de l'acidification et de la fusion du phagosome qui contient *M. avium*, et si

le mécanisme microbiostatique de l'IFN γ et du TNF α consiste en une augmentation de l'acidification du phagosome, quels peuvent être les rôles de l'oxide nitrique (NO) et de la disponibilité du fer dans la survie et la croissance de *M. avium* chez la souris? Y a-t-il un lien entre la fonction du gène *Nramp1* et le métabolisme du fer?

Afin de répondre à ces questions, nous avons infecté des macrophages *in vitro* et effectué des infections *in vivo*. Après avoir transféré *M. avium* dans le compartiment phagolysosomal du macrophage murin dérivé de la moelle (BMM \emptyset), nous avons étudié la capacité de survie et de multiplication de la bactérie dans ce nouveau compartiment. Nous avons comparé le pH des phagosomes qui contenaient *M. avium* dans des BMM \emptyset soit non activés soit activés par l'IFN γ et le TNF α . Nous avons comparé l'effet de ces mêmes cytokines sur la croissance intracellulaire de *M. avium* soit dans le macrophage normal, soit dans le macrophage rendu incapable de production d'oxide nitrique (iNOS $^{-/-}$). Nous avons étudié l'effet des chélateurs du fer sur la croissance de *M. avium* dans le BMM \emptyset , ainsi que l'effet d'un régime carencé en fer sur la croissance bactérienne *in vivo*. Nous avons évalué l'effet d'une surcharge en fer sur la croissance de *M. avium* *in vivo* dans des souris exprimant soit l'allèle *Nramp1* de résistance soit celui de susceptibilité.

Ce travail nous mène aux conclusions suivantes:

1. *M. avium* survit à l'intérieur des vacuoles acides du macrophage.
2. L'inhibition de croissance dans le macrophage induite par l'IFN γ et le TNF α ne dépend ni d'une augmentation de l'acidification du phagosome contenant *M. avium*, ni de production accrue d'oxide nitrique.
3. L'oxide nitrique produit durant l'infection par *M. avium* de la souris exerce un effet négatif sur la capacité de l'hôte de contrôler l'infection.

4. La croissance de *M. avium* est fonction de la disponibilité du fer, tant in vitro qu'in vivo.

5. L'avantage des souris *Nramp1^r* par rapport aux souris *Nramp1^s* dans leur résistance vis-à-vis de l'infection par *M. avium* se perd lors d'une surcharge en fer.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que *M. avium* est très résistant vis-à-vis de la plupart des mécanismes antimicrobiens connus du macrophage. Le fait que *M. avium* ne cause que rarement une maladie suggère que le macrophage contrôle sa croissance via des mécanismes encore inconnus. Ceux-ci pourraient dépendre du contact direct entre le macrophage et les autres cellules immunitaires. Les résultats présentés ici confirment le rôle important d'une protéine NRAMP1 fonctionnelle dans le contrôle de l'infection par *M. avium* et suggèrent fortement que cette protéine a pour fonction de restreindre l'accès de la bactérie au fer. Ils confirment également l'importance du développement d'une réponse cellulaire T spécifique qui puisse aider le macrophage à vaincre l'infection. Ils révèlent par ailleurs le rôle négatif joué par le NO dans cette infection. Nous suggérons par conséquent l'inclusion, dans le traitement de l'infection par *M. avium*, à la fois d'une restriction du fer et d'une inhibition de l'activité de l'oxide nitrique.

Primeira Parte
Introdução

Capítulo I

O género *Mycobacterium*

1. Importância clínica

O género *Mycobacterium* inclui cerca de 19 espécies de bactérias que podem parasitar e causar doença no Homem (Sommers e Good, 1985). Enquanto a grande maioria destes microrganismos só raramente causa doença, algumas espécies são importante causa de morbilidade e mortalidade na população humana. A tuberculose (doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*) é a principal causa de morte por doença infecciosa em todo o Mundo (Daniel et al, 1994). A lepra (causada por *M. leprae*), doença debilitante e causadora de grandes problemas sociais, continua a afectar cerca de 10 milhões de pessoas (WHO Report, 1988). O *M. avium* é um dos mais frequentes agentes de infecções oportunistas em doentes com SIDA (Jones et al, 1998).

As micobactérias estão entre as bactérias mais antigas que habitam a Terra e provavelmente a espécie humana contacta com elas desde o seu surgimento. Assim, muitos dos aspectos da interacção entre parasita e hospedeiro que hoje observamos são provavelmente resultado da adaptação gradual de um e outro, tendendo a garantir a sobrevivência das duas espécies em co-habitação. A tuberculose afecta a espécie humana desde pelo menos 5000 anos A.C. (Evans, 1998, Daniel, 1994). As primeiras evidências da existência da lepra remontam a 1000 anos A.C.. A partir do início do século XVII, com o crescimento das cidades europeias e a consequente concentração da população, a tuberculose tomou proporções de epidemia. Durante os dois séculos seguintes, tornou-se a principal causa de morte na Europa Ocidental, estimando-se

que no início do século XIX uma em cada quatro mortes eram devidas a esta doença (Daniel et al, 1994).

Os agentes da lepra e da tuberculose foram descobertos nos finais dos século XIX, de forma independente, por Hansen e Robert Koch respectivamente, confirmando a há muito suspeitada natureza transmissível destas doenças. Posteriormente foi reconhecido que as manifestações de tuberculose vistas em vários animais eram provocadas por bacilos semelhantes, que vieram a ser classificados como espécies diferentes dentro do género *Mycobacterium*. Foi também reconhecido que a tuberculose bovina (por *M. bovis*) poderia ser transmitida ao Homem pelo consumo de leite contaminado (Evans, 1998).

Estas descobertas foram fundamentais para o início de uma nova era no controlo da tuberculose, já que permitiram um diagnóstico mais rigoroso da doença e a tomada de medidas eficazes para o controlo da sua transmissão. Assim, foram introduzidas, entre outras, a medida do isolamento dos doentes em Sanatórios e a obrigatoriedade de pasteurizar o leite (Evans, 1998, Daniel et al 1994, Smith and Moss, 1994). A mortalidade devida a tuberculose começou a diminuir na Europa Ocidental, na segunda metade do século XIX. Esta tendência acentuou-se na década de 40 do nosso século, com a introdução de antibióticos com actividade contra as micobactérias.

A tendência para a diminuição da incidência e mortalidade devida à tuberculose manteve-se por mais de um século, gerando a ilusão, nos países mais desenvolvidos, de que esta era uma doença controlada e com tendência a desaparecer. A partir de meados da década de 1980, contudo, esta tendência inverteu-se surgindo um crescimento do número de pessoas afectadas pela tuberculose. Algumas das razões apontadas para este aumento são o surgimento da SIDA e de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos antibióticos (Evans, 1998, Daniel et al 1994).

Actualmente, estima-se que cerca de um terço da população mundial (1,7 mil milhões de pessoas) está infectado com *M. tuberculosis* (Snider, 1994). Segundo estimativas recentes, terão havido 6,7 milhões de novos casos e 2,4 milhões de mortes devidas à tuberculose durante o ano de 1998 (Murray & Salomon, 1998). A maior dificuldade encontrada actualmente para o controlo da infecção é o surgimento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes a um ou vários dos antibióticos usados correntemente. Este problema tem-se enfrentado com a aplicação de combinações de vários antibióticos, o que torna o tratamento caro e de difícil cumprimento por parte dos doentes, principalmente se tivermos em conta que 95% do total de novos casos ocorrem em países em desenvolvimento (Snider et al 1994). O mesmo problema se coloca para o controlo da lepra, que afecta principalmente a América do Sul, África, o sudoeste asiático e a Índia, com o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes à Dapsona, o fármaco há décadas usado com sucesso para o seu tratamento (Stewart-Tull, 1982).

Uma aproximação muitas vezes mais eficaz e menos cara no controlo das doenças infecciosas é a vacinação das populações em risco. Desde 1924 que crianças de vários países do Mundo (incluindo Portugal) são vacinadas contra a tuberculose com um bacilo vivo atenuado, a estirpe BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) do *Mycobacterium bovis*. (Evans, 1998, Daniel et al 1994). A eficácia da vacinação com BCG na prevenção da tuberculose varia no entanto, entre zero e 80%, dependendo da população onde é testada. A vacina parece ser eficaz na prevenção da meningite provocada em crianças por micobactérias e também parece conferir alguma protecção contra a lepra e contra infecções por micobactérias ambientais (Grange, 1998, Holland, 1996). Dada a limitada eficácia na protecção contra a tuberculose, e o facto de interferir com o diagnóstico das infecções por micobactérias, vários

países, incluindo os E.U.A., nunca a adoptaram. O desenvolvimento de uma nova vacina contra a tuberculose tem sido o objectivo de inúmeras equipas de investigadores em todo o Mundo nas últimas décadas.

Segundo um conjunto de dados epidemiológicos, estima-se que apenas 10% das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* ficam de facto doentes com tuberculose em alguma fase da sua vida. Nos restantes 90%, a infecção permanece latente (Hopewell, 1994, Grange, 1998). Números semelhantes aplicam-se à lepra. A diminuição da incidência e da mortalidade quer devida à tuberculose, quer devida à lepra, tem acompanhado, nas várias regiões do globo, a melhoria das condições de vida das populações, independentemente da disponibilidade de novas terapias anti-bacterianas. Por outro lado, muitos doentes recuperaram da tuberculose apenas pela permanência em Sanatórios, ou pela mudança de comportamentos alimentares e higiénicos. Estes dados indicam claramente que há mecanismos do hospedeiro que são capazes de impedir a progressão da doença em determinadas circunstâncias. A compreensão destes mecanismos poderá constituir uma via importante para o futuro controlo destas doenças, numa altura em que quer a quimioterapia, quer a vacinação parecem falhar.

As espécies de *Mycobacterium* não mencionadas acima são muitas vezes designadas em conjunto como "micobactérias que não a da tuberculose" e consideradas pouco patogénicas para a espécie humana, devido à baixa frequência com que causam doença. São organismos de vida livre, normalmente encontrados no ambiente. O *Mycobacterium avium* (muitas vezes agrupado com o *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* no chamado Complexo do *Mycobacterium avium* e *intracellulare*, ou MAC) é uma dessas micobactérias, encontrada normalmente no solo, na água e no leite (Benson & Ellner, 1993,

Falkinham, 1996, Banks and Campbell, 1998, Reddy, 1998). Sendo uma importante causa de doença em aves de capoeira e gado suíno (Inderlied et al, 1993), raramente provoca doença em seres humanos imunocompetentes (incidência inferior a 10 por 100 000 habitantes). Fora do contexto da SIDA, a maior parte dos casos de infecção humana por *M. avium* (e por outras micobactérias que não a da tuberculose) são pulmonares e surgem em doentes com outras patologias do pulmão: pneumoconiose e silicose, o hábito de fumar, alterações estruturais do pulmão (Falkinham, 1996, Reddy, 1998). Há também registo de casos de infecção de tecidos moles, assim como alguns casos de linfadenite em crianças que poderão ser causados por *M. avium* (Banks and Campbell, 1998, Falkinham, 1996).

A incidência e prevalência da infecção por *M. avium* aumentou fortemente com o aparecimento da SIDA. Em países como os E.U.A., Austrália, Brasil, Alemanha e Inglaterra, entre 25 e 50% dos doentes com SIDA têm também infecções por MAC, uma prevalência muito maior do que as infecções por qualquer outra espécie de micobactéria que não a da tuberculose. Ao contrário do que acontece nos indivíduos imunocompetentes, o *M. avium* em indivíduos com SIDA não se confina ao pulmão, disseminando-se a vários órgãos e provocando geralmente bacteremia. A infecção por *M. avium* tende a ocorrer numa fase tardia da infecção pelo HIV, havendo uma forte correlação entre o aparecimento desta infecção e a redução do número de células T CD4+ na circulação (Benson & Ellner, 1993, Falkinham, 1996, Reddy, 1998). O *M. avium*, à semelhança de outras micobactérias que não o *M. tuberculosis*, é naturalmente resistente à maioria dos antibióticos sendo o controlo da infecção dependente da recuperação dos níveis de células T. A terapia anti-bacteriana parece, no entanto, ser eficaz na diminuição dos sintomas da infecção e no aumento da sobrevivência (Banks and

Campbell, 1998, Chin et al, 1994). Recentemente, foram desenvolvidos novos antibióticos do grupo dos macrólidos que apresentam efeito inibitório sobre o *M. avium*. Um desses compostos é a claritromicina, que conjuntamente com o etambutol é hoje a terapia recomendada para iniciar o tratamento das infecções por *M. avium*. Por outro lado, dado o elevado risco de infecção por *M. avium* que apresentam os doentes de SIDA com contagens de células T CD4⁺ inferior a 100/ μ l, tem-se iniciado a terapia anti-bacteriana com carácter profiláctico, neste caso com a molécula rifabutina (Benson & Ellner, 1993). Infelizmente, também no caso da infecção por *M. avium* se têm verificado casos de resistência secundária aos antibióticos (Falkinham, 1996).

Num estudo efectuado numa população de 19000 doentes com SIDA em diferentes estados norte-americanos, publicado em 1998, o *M. avium* disputa com o *Pneumocystis carinii* o 1º lugar no tipo de infecção oportunista mais frequente, sendo nestes grupos 10 vezes mais frequente do que a tuberculose (Jones et al, 1998). Neste estudo também é evidente que a incidência da maior parte das infecções oportunistas, incluindo o *M. avium*, diminuiu entre 1991 e 1996, como resultado da implementação de medidas profilácticas.

Extendendo o que foi dito anteriormente em relação ao *M. tuberculosis* e *M. leprae*, o *M. avium* é um exemplo ainda mais dramático de como um agente infeccioso pode conviver com a população humana sem causar doença, excepto quando o equilíbrio parasita-hospedeiro se rompe, neste caso numa situação de grave imunossupressão.

2. Biologia

As micobactérias são bacilos identificados laboratorialmente pela característica de serem álcool-ácido resistentes, ou seja, após coloração com fucsina básica e ao contrário do que acontece com a maior parte das bactérias, não descoram quando são lavadas com álcool ácido (Sommers e Good, 1985).

Estruturalmente, as micobactérias assemelham-se a bactérias de tipo Gram positivo, embora não corem pelo método de Gram. As micobactérias têm no entanto na sua parede, para além do peptidoglicano, uma série de moléculas que as distingue das bactérias Gram positivo. Ligado covalentemente ao peptidoglicano, está o polissacarídeo arabinogalactano, um polissacarídeo de cadeias ramificadas, no extremo das quais é esterificado com ácidos gordos de alto peso molecular, os ácidos micólicos (Brennan e Draper, 1994). Os ácidos micólicos, que possuem 70 a 90 átomos de carbono, são característicos do género *Mycobacterium* e a sua composição exacta varia de espécie para espécie (Falkinham, 1996). O conjunto peptidoglicano-arabinogalactano-micolatos forma o esqueleto fundamental da parede das micobactérias. Associadas a este esqueleto estão muitas outras moléculas, principalmente lípidos e glicolípidos, cuja natureza difere também de espécie para espécie (Falkinham, 1996). A espécie *M. avium* engloba uma enorme variedade de estirpes, que se distinguem pelo tipo e quantidade de glicopeptidolípidos (GPLs) presentes na parede bacteriana. As propriedades antigénicas dos GPLs permitiram a classificação do *M. avium* em serotipos, que tem alguma utilidade em estudos epidemiológicos. A serotipagem não é no entanto útil para estudos epidemiológicos dos doentes com SIDA, porque a maior parte dos doentes está infectada com um número limitado de serotipos, nomeadamente o 1, o 4 e o 8 (Benson & Ellner, 1993, Benson

1994, Reddy, 1998). A composição dos GPLs da parede condiciona também a morfologia das colónias formadas em meio sólido. Assim, diferentes estirpes de *M. avium* podem dar origem a colónias de morfologia lisa e transparente (normalmente designadas SmT, do inglês Smooth Transparent), lisas e opacas (SmD, Smooth Domed) ou rugosas (Rough). Estirpes do morfotipo SmT parecem ter maior virulência do que as estirpes congénicas de morfotipo SmD (Benson & Ellner, 1993). Os GPLs isolados dos dois morfotipos (SmT e SmD) revelam um perfil de indução de citoquinas em macrófagos infectados semelhante ao que é induzido pelos microrganismos intactos, indicando ser de facto o GPL responsável pelas diferenças de acção biológica entre as estirpes (Benson & Ellner, 1993). Durante as passagens do *M. avium* in vitro, há mudança do morfotipo SmT para SmD com uma frequência de 10^{-4} a 10^{-5} , com uma possível perda de virulência, mas não se sabe quais são os mecanismos moleculares desta mudança (Benson & Ellner, 1993). A transição inversa (de SmD para SmT) também pode ocorrer, mas numa frequência muito mais baixa (Benson & Ellner, 1993). Quando um ratinho é infectado com um inóculo de morfotipo SmD ou uma mistura de SmD e SmT, podem vir a recuperar-se apenas bactérias de morfotipo SmT. Não é claro se esta alteração corresponde a uma transição in vivo do morfotipo SmD para o SmT ou a uma selecção das bactérias SmT existentes no inóculo inicial (Pedrosa et al, 1994). O *M. avium* isolado de doentes com SIDA é frequentemente uma mistura de diferentes morfotipos (Benson & Ellner, 1993), mas o morfotipo mais frequentemente isolado é o SmT, que para além de ser mais virulento, é também mais resistente aos antibióticos (Inderlied, 1993, Reddy, 1998).

A grande quantidade de lípidos presentes na parede é uma característica fundamental que distingue o género *Mycobacterium* e justifica uma série de comportamentos que lhe são típicos: a resistência à

descoloração com álcool-ácido, a elevada hidrofobicidade e a tendência para formar grumos em meio aquoso são alguns exemplos. A grande quantidade de lípidos torna também esta parede relativamente impermeável a solutos aquosos, o que poderá condicionar quer o acesso a nutrientes, quer a entrada dos antibióticos usados na terapêutica, ou ainda das moléculas com efeito antimicrobiano produzidas pelo hospedeiro infectado (Brennan e Draper, 1994).

Ancoradas na membrana citoplasmática, estão outras moléculas que são características das micobactérias: o lipoarabinomanano (LAM), lipomanano (LM) e fosfatidil-inositol manosídeos (PIM). O LAM é um lipopolissacarídeo com uma cadeia longa, que atravessa toda a parede bacteriana, expondo os resíduos terminais à superfície da célula. Constitui provavelmente a estrutura filamentosa visível ao microscópio electrónico no limite exterior da célula bacteriana, muitas vezes considerada uma cápsula (Brennan e Draper, 1994, Besra e Chatterjee, 1994). O LAM, à semelhança de outros lipopolissacarídeos bacterianos, interage com as células do sistema imune do hospedeiro infectado, mediando uma grande variedade de efeitos biológicos. Entre estes efeitos, contam-se a inibição da activação de células T, inibição da activação do macrófago pelo $\text{IFN}\gamma$, inactivação de radicais de oxigénio e indução da produção de várias citocinas, nomeadamente $\text{TNF}\alpha$, pelos macrófagos (Chatterjee et al, 1992, Besra e Chatterjee, 1994). Sabe-se, no entanto, que existem diferenças estruturais entre o LAM presente em diferentes estirpes de *M. tuberculosis*. Nomeadamente, o LAM presente na parede de estirpes pouco virulentas de *M. tuberculosis* possui resíduos de manose adicionais na sua extremidade não redutora, ou seja, na extremidade em contacto com as células do hospedeiro. As moléculas de araLAM (sem resíduos de manose na extremidade) têm maior capacidade para estimular a produção de $\text{TNF}\alpha$ pelo macrófago do que

o manLAM (LAM manossilado) (Chatterjee et al, 1992). Adicionalmente, o araLAM tem maior capacidade de activar a produção de outras citocinas pró-inflamatórias pelo macrófago, assim como a sua produção de radicais de azoto (Roach et al, 1993). São os componentes da parede bacteriana e provavelmente o LAM que têm o efeito "adjuvante", ou seja, de activação inespecífica de células do sistema imune, característico das micobactérias.

Foram recentemente descobertas associadas à parede das micobactérias (*M. chelonae*) proteínas do tipo porina (Trias et al, 1992, Trias & Benz, 1993). As porinas são proteínas que formam canais hidrofílicos através da membrana externa das bactérias Gram negativo, facilitando a passagem de solutos aquosos. Diferenças na densidade de porinas, poderão, em adição às diferenças de permeabilidade conferidas pela composição lipídica, justificar as diferenças de susceptibilidade aos antibióticos entre as diferentes espécies de micobactérias (Inderlied, 1993, Brennan e Draper, 1994). Estas proteínas poderão também estar envolvidas na aquisição de nutrientes por parte das bactérias.

Em geral, as micobactérias crescem mais lentamente em meios de cultura do que a maior parte das bactérias. Podem, no entanto, distinguir-se dois grupos, o das espécies de crescimento "rápido", que demoram cerca de 3 a 4 dias a formar colónias em meio sólido e as de crescimento mais lento, que demoram de uma a três semanas. As espécies que apresentam maior patogenicidade para o Homem, incluindo *M. tuberculosis* e *M. avium*, pertencem ao grupo de crescimento lento. O *M. leprae* não cresce em nenhum meio de cultura testado até hoje (Wheeler & Ratledge, 1994, Falkinham, 1996). A análise da sequência nucleotídica da unidade 16S dos ribossomas tem permitido elaborar árvores filogenéticas das diferentes espécies de micobactérias e concluir que as de crescimento lento e as de crescimento rápido pertencem a dois

grupos distintos. As micobactérias de crescimento lento têm uma só cópia de cada um dos genes para o RNA ribossomal (16S, 23S e 5S), enquanto as espécies de crescimento rápido têm duas cópias. Outras bactérias têm geralmente mais: a *E. coli* tem 7, o *Streptomyces lividans* tem 6. Isto poderá limitar a velocidade de síntese proteica e portanto do crescimento das micobactérias (Falkinham, 1996).

As micobactérias são capazes de oxidar uma grande variedade de compostos para gerar energia. São também capazes de sintetizar todos os metabolitos de que precisam, incluindo todos os aminoácidos. As bactérias que parasitam animais encontram provavelmente in vivo todos os metabolitos disponíveis em excesso (Wheeler & Ratledge, 1994). Por crescerem no hospedeiro infectado intracelularmente, um factor que pode ser limitativo é o oxigénio. Não se sabe como é que as micobactérias, sendo aeróbios estritos, têm acesso ao oxigénio no interior das células, mas especula-se que este factor seja importante para a preferência pela localização no pulmão, onde a pressão parcial de oxigénio é máxima (Wheeler & Ratledge, 1994).

A maior parte das micobactérias que crescem em meios de cultura in vitro não exige nenhum factor de crescimento ou vitamina para se multiplicar. Notáveis excepções são a exigência de micobactina pelo *M. paratuberculosis* e algumas estirpes de *M. avium* e de hemina pelo *M. haemophilum* (Wheeler & Ratledge, 1994). Ambas as moléculas ligam ferro. À semelhança do que acontece com outras bactérias, as micobactérias desenvolveram um sistema de captação do ambiente do nutriente fundamental que é o ferro. Este sistema inclui dois tipos de sideróforos (moléculas de baixo peso molecular capazes de quelar o ferro): as micobactinas e as exoquelinas. As micobactinas são moléculas intracelulares, ligadas à membrana citoplasmática da micobactéria e parecem ser capazes de armazenar ferro. As exoquelinas, pelo

contrário, são excretadas para fora da célula, ligando o ferro no exterior. À superfície da parede bacteriana existem receptores específicos para a exoquelina (IREPs- Iron Regulated Envelope Proteins), que facilitam o seu transporte, depois de saturada com ferro, através da parede até à membrana, onde o ferro é transferido para a micobactina. A afinidade das exoquelinas para o ferro é muito grande e são capazes de extrair ferro da ferritina ou da transferrina. A síntese de exoquelinas e micobactinas é estimulada quando as bactérias são cultivadas *in vitro* em condições de escassez de ferro, mas nunca foram encontradas *in vivo* (Wheeler & Ratledge, 1994).

Capítulo II

Patogénese e imunologia da infecção por *M. avium*

1. No Homem

O *M. avium* tem uma distribuição ubíqua no ambiente e a frequência de respostas imunes específicas indica que cerca de 70% da população humana lhe é permanentemente exposta (Inderlied, 1993, Holland, 1996). No entanto, menos de 10 pessoas em cada 100 000 (0.01%) apresentam doença causada por este microrganismo. Pelo contrário, dentro da população dos doentes com SIDA, a prevalência da infecção por MAC pode atingir os 50% (Inderlied et al, 1993). Trata-se pois de uma infecção para a qual o sistema imune normal tem respostas eficazes, que será importante compreender.

A principal fonte de contaminação dos seres humanos com *M. avium* parece ser a água da torneira. O facto de nos indivíduos sem imunodeficiência a infecção por *M. avium* se restringir frequentemente ao pulmão, sugere que a via respiratória (pela inalação de aerossóis) é uma porta de entrada possível para a bactéria. Também num número elevado de doentes com SIDA o *M. avium* é isolado pela primeira vez de secreções respiratórias, vindo a desenvolver-se posteriormente infecção disseminada (Benson e Ellner, 1993). Por outro lado, a disseminação nestes doentes é precedida frequentemente por indícios de colonização do tracto intestinal, com amostras de fezes positivas para a presença de *M. avium* e análise histológica revelando o envolvimento das placas de Peyer e dos nódulos linfáticos mesentéricos (Inderlied, 1993).

Nas mucosas respiratória ou intestinal, normalmente os microrganismos são retidos pelo muco e eliminados pelos movimentos ciliares ou peristálticos. A aderência e invasão das células epiteliais

poderá ser uma forma eficaz de evitar essa eliminação. Não existem dados objectivos que nos permitam compreender como é que o *M. avium* estabelece a colonização das mucosas, mas estudos in vitro mostraram que a bactéria é capaz de ligar-se e invadir células epiteliais do intestino humano, assim como células da orofaringe (Inderlied, 1993).

Uma vez estabelecida a colonização eficaz das mucosas, o *M. avium* terá que enfrentar a segunda linha de defesa inata do organismo, que são as células mononucleares fagocíticas. Os macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos, incluindo as mucosas e têm a capacidade de detectar, ingerir e destruir os organismos estranhos que com eles contactem. Ao contrário do que acontece com a maior parte dos microrganismos, após a fagocitose pelo macrófago, o *M. avium* não é destruído, mas persiste e prolifera no interior destas células. A fagocitose de microrganismos desencadeia no entanto a produção de citocinas, como o TNF α e a Interleuquina-1 por parte do macrófago. Estas, juntamente com os próprios produtos bacterianos, vão iniciar uma resposta inflamatória, atraindo, fixando e activando outras células imunocompetentes, que poderão ajudar o macrófago a destruir os microrganismos fagocitados. É o que acontece nos indivíduos imunocompetentes, em que a infecção por *M. avium* é acompanhada da formação de granulomas nos locais de entrada do parasita, nomeadamente o pulmão. Nesses granulomas, os macrófagos infectados são rodeados de monócitos e linfócitos recrutados do sangue periférico. Estas células vão activar o macrófago para a inibição do crescimento das bactérias no seu interior e a infecção fica contida num dado local. Nos doentes com SIDA, estes mecanismos parecem não ser suficientemente eficazes, resultando a infecção disseminada, ou seja, a presença do *M. avium* em praticamente todos os órgãos e tecidos, incluindo a medula

óssea, o fígado e o baço. O *M. avium* é encontrado no interior de macrófagos, mas geralmente não há a formação de verdadeiros granulomas ou estes são escassos (Torriani et al, 1996). Os sintomas associados à infecção são de carácter sistémico, como: febre, suores nocturnos e perda de peso (Benson e Ellner, 1993). Duas alterações laboratoriais associadas à infecção por *M. avium* são a anemia e o aumento dos níveis de fosfatase alcalina no soro (Benson e Ellner, 1993). A infecção por *M. avium* está associada a uma diminuição da sobrevivência dos doentes com SIDA (Benson e Ellner, 1993, Chin et al, 1994), mesmo não sendo frequentemente a causa directa da morte. Nos raros casos em que o *M. avium* é a causa directa da morte do indivíduo, esta resulta da falha de múltiplos órgãos infectados (Torriani, 1994).

Nos indivíduos com SIDA, há uma forte correlação entre o nível de células T CD4⁺ na circulação sanguínea e o risco de infecção disseminada por *M. avium* (Benson & Ellner, 1993). Esta observação sugere que há mecanismos dependentes de células T CD4⁺ que são relativamente eficazes na contenção da infecção por *M. avium*. Uma das funções dos linfócitos T CD4⁺ é a produção de citocinas, nomeadamente IFN γ , que activam o macrófago, aumentando a sua capacidade anti-microbiana. A Interleuquina-12 (IL-12), por sua vez, é um estímulo importante para que os linfócitos T produzam IFN γ . A importância destas citocinas na infecção humana por *M. avium* foi recentemente revelada de forma inequívoca. Foram identificados, pela sua anormal susceptibilidade a infecções por espécies não patogénicas de micobactérias, indivíduos com deficiências em quatro genes envolvidos na produção de ou resposta ao IFN γ . São eles os genes do receptor 1 do IFN γ (IFN γ R1), do receptor 2 do IFN γ , da cadeia β 1 do receptor da IL-12 e da cadeia p40 da IL-12. Indivíduos com deficiência completa de um dos receptores do IFN γ apresentaram-se com infecções fatais por

espécies pouco patogénicas de micobactérias, refractárias à terapia antibacteriana. Doentes com deficiências parciais do receptor do IFN γ ou deficiência completa da IL-12 ou do seu receptor, têm infecções ainda graves, mas não tanto como os anteriores e geralmente respondem favoravelmente ao tratamento com antibióticos ou com IFN γ . De notar, que os doentes com qualquer destas anomalias apresentam de forma selectiva infecções por parasitas intracelulares dos macrófagos, nomeada e principalmente micobacterioses e nalguns casos salmoneloses, mas não outro tipo de infecções bacterianas (Ottenhoff, 1998, Holland, 1996). Estes resultados põem em evidência a importância fundamental da capacidade anti-microbiana do macrófago no controlo ou não da infecção por *M. avium* e o papel central do IFN γ no aumento dessa capacidade. Curiosamente, em estudos feitos *in vitro* com macrófagos derivados dos monócitos de sangue periférico humanos, o efeito do IFN γ no crescimento intracelular do *M. avium* nunca ficou esclarecido. Os resultados descritos incluem um efeito inibidor do crescimento (Johnson et al, 1991), ausência de qualquer efeito (Toba et al, 1989) ou mesmo estimulação do crescimento (Benson & Ellner, 1993, Holland, 1996).

Resultados contraditórios foram também obtidos quando monócitos derivados de doentes com SIDA foram comparados com monócitos de indivíduos normais em relação à sua capacidade de restringir o crescimento do *M. avium* *in vitro*. Crowle e colaboradores (1992) observaram que os monócitos derivados de indivíduos com SIDA eram mais permissivos, enquanto Johnson e colaboradores (1991) não encontraram diferenças. Embora nem todos os resultados sejam concordantes, há também indicações de que a incubação de macrófagos normais *in vitro* com HIV ou a proteína gp120 dele derivada favorece o crescimento concomitante do *M. avium* (Meylan et al, 1992). A este

aumento do crescimento corresponde também um aumento da produção pelos monócitos de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-1 β (Källenius et al, 1992, Newman et al, 1993, Shiratsuchi et al, 1994). Em concordância com estes dados obtidos in vitro, encontram-se níveis aumentados de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-1 β no soro de doentes com SIDA infectados simultâneamente com *M. avium*, quando comparados com os encontrados em indivíduos na mesma fase da SIDA, mas não infectados com *M. avium* (Denis & Ghadirian, 1994, Haug et al, 1996). Estas observações poderão estar relacionadas com o tipo de sintomas dos doentes com infecção disseminada por *M. avium*, como febre, perda de peso e suores nocturnos. Alguns estudos recentes têm indicado também que a infecção com *M. avium* pode aumentar a susceptibilidade dos monócitos à multiplicação do HIV (Ghassemi et al, 1995, Wahl et al, 1998). Algumas das alterações induzidas nos monócitos pelo *M. avium* que poderão estar relacionadas com o aumento do crescimento consequente do HIV são: o aumento da expressão da molécula CCR5 (molécula que pode ser utilizada pelo HIV para penetrar nas células), a indução da expressão de $\text{TNF}\alpha$ e a activação do factor nuclear NF-kB (Wahl et al, 1998, Giri et al, 1998).

Crowle e colaboradores consideram que a transferrina presente no soro inibe o crescimento do *M. avium*, ao quelar o ferro e diminuir a sua disponibilidade para a bactéria. O soro dos indivíduos com SIDA parece ter menor actividade inibitória do que o de indivíduos normais (Crowle et al, 1989, Douvas et al, 1992, Douvas et al, 1993). De facto, os doentes com SIDA têm alterações do metabolismo do ferro que levam também à sua acumulação anormal nos tecidos, nomeadamente nos macrófagos (Boelaert et al, 1996). Dada a necessidade de ferro que o *M. avium* tem para o seu crescimento, este elemento poderá ser um factor importante na interacção parasita-hospedeiro.

À exceção das "experiências naturais" fornecidas pelos raros casos de doentes com deficiências genéticas, a compreensão dos mecanismos da resposta imune dos indivíduos normais à infecção por *M. avium* é difícil de obter. As experiências feitas *in vitro* com monócitos isolados têm sido particularmente pouco elucidativas, dada a enorme variabilidade de resultados encontrados, provavelmente resultante de variações biológicas entre os dadores. É pois de grande utilidade o estudo da infecção por *M. avium* num modelo experimental de infecção, como o modelo murino, onde é possível fazer intervenções exploratórias e onde as respostas não são sujeitas a tanta variabilidade, dada a homogeneidade genética das estirpes de ratinho disponíveis.

2. No ratinho

Quando um ratinho é experimentalmente infectado com *M. avium*, o curso da infecção pode variar desde a eliminação gradual do parasita, até ao crescimento incontrolado que leva à morte do animal. Esse padrão de crescimento é determinado, em termos gerais, pelo grau de virulência da bactéria e pelos mecanismos de resistência do hospedeiro.

Tal como foi referido no capítulo anterior, a espécie *M. avium* é caracterizada por uma grande variedade de estirpes com virulências muito diferentes. Pedrosa e colaboradores (1994) infectaram uma mesma estirpe de ratinhos com 41 estirpes de *M. avium* obtendo padrões de crescimento muito díspares. Apesar de a virulência das estirpes ser relacionável quer com a origem dos isolados da bactéria quer com o morfotipo das colónias por elas formadas, nenhum destes factores era suficiente para prever o comportamento de um determinado isolado.

Assim, os factores determinantes da virulência de uma determinada estirpe de *M. avium* continuam a não ser conhecidos.

Para tentar compreender os mecanismos de defesa do hospedeiro que são fundamentais para determinar o curso da infecção, tem utilidade usar uma estirpe de *M. avium* com virulência intermédia, de forma a ser possível aumentar ou diminuir o seu crescimento, manipulando a resposta imune do hospedeiro. Quando um ratinho é infectado com uma estirpe de *M. avium* de virulência intermédia, o crescimento é mais rápido na fase inicial, que dura cerca de 30 dias, mas depois é controlado, atingindo um patamar. O controlo do crescimento do *M. avium* visto depois dos trinta dias de infecção é devido ao aparecimento de células T específicas, ou seja, ao emergir de uma resposta imune secundária ou adquirida (Appelberg e Pedrosa, 1992). As células T necessárias para este controlo do crescimento do *M. avium* são do tipo CD4+, enquanto que as células T CD8+ não parecem ser importantes (Appelberg et al, 1994a; Orme et al, 1992; Saunders e Cheers, 1995). A acção protectora das células T CD4+ passa pela produção de IFN γ e TNF α , já que a neutralização destas citocinas com anticorpos específicos impede também o controlo da infecção (Appelberg et al, 1994a; Orme et al, 1992; Saunders e Cheers, 1995). Uma das funções do IFN γ e do TNF α é a de actuar sobre os macrófagos, aumentando a sua capacidade antimicrobiana. Macrófagos de ratinho cultivados in vitro inibem o crescimento intracelular do *M. avium* quando tratados com estas citocinas (Appelberg e Orme, 1993). Por outro lado, o próprio macrófago é capaz de produzir TNF α durante a infecção por *M. avium*, sendo o IFN γ um estímulo para o aumento dessa produção (Appelberg et al 1994a). Outro papel fundamental do IFN γ e do TNF α produzidos ou induzidos pelas células T CD4+ é a indução da formação do granuloma no local da infecção (Hänsch et al 1996).

Verifica-se pois que, tal como na infecção humana, o controlo da infecção pelo *M. avium* é conseguido de forma eficaz pela indução de linfócitos T específicos, que produzem citocinas estimuladoras do macrófago, como o IFN γ e o TNF α . Durante a fase inicial da infecção, de cerca de 30 dias, não existem no entanto células T específicas e o crescimento do *M. avium* depende apenas dos componentes da chamada imunidade inata. Os tipos de células normalmente associados a este tipo de imunidade são o macrófago, o neutrófilo e as células NK (Natural Killer). Estas células vão ser importantes, não só na contenção inicial do crescimento do *M. avium*, mas também numa eficaz estimulação da resposta imune secundária.

Para que haja a indução de células T protectoras é necessária a produção de pelo menos duas citocinas: a Interleuquina 6 (IL-6) e a IL-12 (Silva et al, 1998; Castro et al 1995, Appelberg et al, 1994b). Embora não sejam conhecidas as células produtoras de IL-6 e IL-12 in vivo, admite-se que seja o macrófago a sua principal fonte.

As células NK (Natural Killer) são linfócitos com capacidade citolítica, sem especificidade antigénica e existem algumas evidências de que são importantes para o crescimento do *M. avium* na fase inicial da infecção no ratinho. Harshan & Gangadharam (1991) viram um aumento do crescimento do *M. avium* em ratinhos que tinham sido depletados de células NK usando anticorpos específicos. Estes resultados não foram no entanto reproduzidos por outros autores (Flórido et al, 1997, Flórido e Appelberg, manuscrito em preparação). Evidências indirectas para um papel importante das células NK vêm de resultados obtidos em ratinhos SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency syndrome), animais que não tendo linfócitos T nem B, possuem uma população NK sobredesenvolvida. Quando ratinhos SCID são tratados com anticorpos neutralizantes para a IL-12 ou para o IFN γ há uma

exacerbação da infecção por *M. avium*, mostrando que estas citocinas estão a ser produzidas endogenamente (Appelberg et al, 1994a, Castro et al, 1995a). Na ausência de linfócitos T, as células NK são as principais candidatas a células produtoras de IFN γ . Também em ratinhos normais, a neutralização da IL-12 leva a um aumento do crescimento do *M. avium* durante os primeiros 30 dias de infecção, que é acompanhado por uma diminuição da produção de IFN γ (Castro et al, 1995a). De acordo com resultados obtidos noutros modelos, é de admitir que a IL-12 e também o TNF α produzidos pelos macrófagos têm uma dupla função: por um lado, activar as células NK para a produção de IFN γ , e por outro estimular a diferenciação de células T produtoras de IFN γ . Smith e colaboradores (1997) verificaram que ratinhos SCID são capazes de induzir a formação de granulomas nos locais de infecção por *M. avium* e que essa formação era dependente da produção de IFN γ e TNF α pelas células NK.

O neutrófilo é outra das células que parece ser importante para o controlo da infecção por *M. avium* no ratinho, embora não esteja esclarecido o mecanismo da sua participação. Quando ratinhos infectados com *M. avium* são depletados de neutrófilos a infecção é exacerbada. Por outro lado, ratinhos *beige*, que possuem uma mutação que altera a função dos neutrófilos são mais sensíveis à infecção por *M. avium*. Este aumento de sensibilidade é revertido pela transferência de neutrófilos de ratinhos normais (Appelberg et al, 1995). A participação do neutrófilo no controlo da infecção por *M. avium* poderá ser devida a um efeito directo do neutrófilo sobre a micobactéria, à produção de citocinas ou à transferência de material neutrofílico para o macrófago infectado (Silva et al, 1989).

Diferentes estirpes de ratinho têm diferentes susceptibilidades ao crescimento do *M. avium*, diferenças essas evidentes desde fases muito

precoces da infecção. Appelberg e Sarmiento (1990) demonstraram que grande parte das diferenças no crescimento inicial do *M. avium* eram devidas à variação de um único gene murino- o gene então chamado *bcg*. O gene *bcg*, ou *Nramp1*, é um gene expresso exclusivamente em macrófagos e que existe em dois alelos, designados r e s. Os ratinhos que expressam o alelo r são mais resistentes a várias infecções por parasitas intracelulares, como *Leishmania donovani*, *Salmonella typhimurium* e algumas micobactérias, do que as estirpes de ratinhos que expressam o alelo s. Este é mais um dado que indica que o controlo do crescimento do *M. avium* é dependente da capacidade antimicrobiana do macrófago. Tal como no Homem, o *M. avium* aloja-se no ratinho no interior dos macrófagos durante todo o curso da infecção (Frehel, 1991). Nos primeiros trinta dias de infecção, vai crescer mais ou menos, conforme o alelo do gene *bcg* que o macrófago infectado expressa, conforme a capacidade das células NK para produzir IFN γ e eventualmente conforme a maior ou menor ajuda proveniente do neutrófilo. Na fase posterior da infecção, o *M. avium* vai continuar a crescer ou não, dependendo da existência de uma resposta T específica, com produção de IFN γ e TNF α . Dentro deste quadro descritivo, há um aspecto da interação do *M. avium* com o hospedeiro murino que continua mal compreendido: quais são os mecanismos que o macrófago possui que lhe permitem ou não controlar o crescimento intracelular do *M. avium*? Ou seja: qual é o mecanismo pelo qual o gene *bcg/ Nramp1* confere resistência ou susceptibilidade? Quais são os mecanismos activados pelo IFN γ e pelo TNF α que tornam o macrófago capaz de conter o crescimento ou mesmo matar o *M. avium* no seu interior? Estes aspectos serão discutidos no capítulo seguinte.

Segunda Parte
Definição de objectivos

Capítulo III

Mecanismos anti-microbianos do macrófago

O macrófago exerce um papel de vigilância que é central na manutenção do equilíbrio do organismo de qualquer mamífero. Cabe-lhe, entre outras, as tarefas de eliminar células envelhecidas, destruir células tumorais, ingerir partículas que penetrem as mucosas e também destruir os microrganismos que penetrem essas mesmas mucosas e evitar que eles se propaguem a outras zonas do corpo. Para exercer estas funções, o macrófago está equipado com algumas armas fundamentais: receptores de superfície que lhe permitem identificar as células ou partículas a ingerir, capacidade de fagocitar essas partículas, mecanismos de destruição intracelular, nomeadamente produção de espécies reactivas de oxigénio e azoto, assim como enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomas. Estes recursos revelam-se extremamente eficazes no controlo da infecção por um grande número de microrganismos. No entanto, alguns, nomeadamente as micobactérias, tiram partido da capacidade fagocítica do macrófago e alojam-se no seu interior, que elegem como habitat. A exposição do macrófago a citocinas produzidas por outros leucócitos, nomeadamente os já mencionados IFN γ e TNF α , ajuda-o a inibir o crescimento ou mesmo eliminar os microrganismos alojados no seu interior, através da potenciação dos mecanismos anti-microbianos já referidos. Alguns dados apontam também para a existência de mecanismos de restrição do acesso dos parasitas intracelulares a nutrientes, nomeadamente ao ferro e ao amino-ácido triptofano, de forma activável por citocinas. Adicionalmente, no ratinho, o crescimento intracelular de alguns parasitas depende de factores genéticos do hospedeiro, como o gene *Nramp1*, sem que seja conhecido o mecanismo deste factor de

resistência. De seguida, serão revistos os mecanismos anti-microbianos do macrófago, com especial ênfase no papel que poderão ter na resposta à infecção por *M. avium*.

1. A fagocitose e a maturação dos fagossomas

A fagocitose não é mais do que a internalização de uma partícula pela célula fagocítica, para posterior destruição no seu interior. É o processo pelo qual o macrófago exerce as suas funções de limpeza do organismo, eliminando partículas estranhas ou células que, sendo do próprio, estão demasiado velhas, entraram em apoptose ou iniciaram um processo tumoral. A internalização é feita à custa do envolvimento da partícula pela membrana citoplasmática do fagócito, resultando na formação de uma vesícula intracelular que se chama fagossoma. Para que o processo seja despoletado, terá que haver o reconhecimento de componentes da superfície da partícula pelos chamados receptores de fagocitose, ou seja, receptores cuja ligação dá origem aos sinais intracelulares necessários para a formação do fagossoma, nomeadamente a polimerização e reorganização das fibras de actina (Greenberg et Silverstein, 1993, Greenberg, 1995, Allen & Aderem, 1996a). O macrófago possui uma grande variedade de receptores ligados à indução da fagocitose. Os mais conhecidos e extensamente estudados são os receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) e os receptores do fragmento Fc das imunoglobulinas (Fc γ R, Fc ϵ R e Fc α R). Estes receptores permitem reconhecer e internalizar partículas opsonizadas respectivamente por fragmentos do complemento ou por anticorpos (Greenberg & Silverstein, 1993). Outros receptores ligam-se a moléculas da matriz extra-celular e poderão estar envolvidos na fagocitose de partículas revestidas com essas moléculas, por exemplo fibronectina (Allen & Aderem, 1996b) ou trombospondina (Savill et al,

1993), produzidas pelo próprio macrófago ou outras células. Alguns tipos de receptores de fagocitose são capazes de reconhecer partículas estranhas, sem qualquer opsonização. O receptor de manose-fucose é um exemplo (Ezekowitz et al, 1990, Taylor & Drickamer, 1993, Stahl & Ezekowitz, 1998). Os resíduos de manose, fucose ou N-acetilglucosamina reconhecidos por este receptor, são comumente encontrados na superfície de bactérias, fungos e parasitas enquanto que proteínas dos mamíferos, raramente os exibem. Outro exemplo é o dos chamados "scavenging receptors", que se ligam com grande afinidade a um vasto conjunto de ligandos polianiónicos. Os "scavenging receptors" desempenham papéis importantes no reconhecimento e internalização pelo macrófago de eritrócitos envelhecidos (Sambrano et al, 1994), de lipoproteínas (Suzuki et al, 1997) e de partículas de material inorgânico que tenham penetrado no pulmão (Kobzik, 1995). Parece também desempenhar um papel importante na internalização de bactérias e LPS bacteriano (Suzuki et al, 1997, Haworth et al, 1997, Dunne et al, 1994, Krieger et al, 1993).

Os macrófagos internalizam o *M. avium*, quer na presença quer na ausência de soro. Na presença de soro, a internalização é no entanto mais rápida (Bermudez et al, 1991), o que será devido à opsonização da bactéria pelo fragmento C3 do complemento, pela fibronectina (Bermudez et al, 1991) ou pela "mannose binding protein" (MBP) (Polotsky et al, 1997). Tal como outras bactérias, o *M. avium* activa a via alternativa do complemento (Swartz et al, 1988). Quando opsonizada por MBP, pode também activar o complemento, quer pela via clássica, quer pela via alternativa (Polotsky et al, 1997). Adicionalmente, foi recentemente descoberto que o *M. tuberculosis* e o *M. avium* produzem uma proteína capaz de ligar o fragmento C2a do complemento, transformando-o numa C3 convertase e assim gerando maior quantidade

da opsonina C3b, que promove a internalização das bactérias pelo receptor CR1 (Schorey et al, 1997). A internalização do *M. avium* parece no entanto envolver maioritariamente o receptor 3 do complemento (CR3), quer na presença quer na ausência de soro (Swartz et al, 1988, Bermudez et al, 1991). Na ausência de soro, são vários os outros receptores que se têm considerado desempenhar algum papel. O *M. avium* parece ligar-se ao macrófago pelos receptores da manose-fucose e da fibronectina (Bermudez et al, 1991, Roecklein et al, 1992). No caso do *M. tuberculosis*, só as estirpes mais virulentas interagem com o receptor da manose-fucose, nomeadamente as estirpes cuja parede tem LAM manosilado (Schlesinger, 1993, Schlesinger et al, 1996). A interacção entre o *M. avium* e o macrófago é parcialmente inibida pelo β -glucano (Roecklein et al, 1992), o que indica que, à semelhança do que acontece com o *M. tuberculosis* (Cywes et al, 1996), a bactéria poderá ligar-se, de forma completamente independente do complemento, a uma região do CR3 que reconhece glicanos (Thornton et al, 1996). O *M. avium* liga-se à superfície de macrófagos derivados de monócitos humanos através do receptor da vitronectina, na ausência de soro (Rao et al, 1993). Liga-se também, com grande afinidade, a várias moléculas da matriz extra-celular, nomeadamente laminina, fibronectina e colagénio do tipo I (Rao et al, 1992, Ratliff et al, 1993), o que poderá promover a sua ligação a receptores para estas moléculas existentes no macrófago.

A ligação de um receptor de fagocitose leva à transdução de sinais para o interior da célula fagocítica, que desencadeiam uma série de processos, muito para além daqueles directamente envolvidos na formação do fagossoma. O tipo de alterações celulares desencadeadas é, naturalmente, diferente conforme o receptor de fagocitose envolvido. Assim, a activação dos receptores Fc γ dá origem à geração de

superóxido, citotoxicidade, produção de citoquinas pro-inflamatórias (TNF α , IL-1, IL-6) e metabolitos do ácido araquidónico (Stein & Gordon, 1991, van de Winkel & Capel, 1993, Ravetch, 1994), enquanto nenhum destes efeitos é visto aquando da activação dos CR (Wright & Silverstein, 1983, Yamamoto & Johnston, 1984, Aderem et al, 1985, Kobzik et al, 1990, Greenberg et Silverstein, 1993). O estudo da fagocitose de partículas pelo receptor de manose revelou que esta dá origem à produção de IL-12 e TNF α pelo fagócito (Shibata et al, 1997). Sendo os Fc γ R e os CR, como foi dito antes, os receptores de fagocitose mais extensamente estudados, foi recentemente descrito que a sua ligação origina a activação de uma série de GTPases de baixo peso molecular envolvidas quer em processos de polimerização e reorganização das fibras de actina, quer em várias vias de transdução de sinal. Uma dessas GTPases, a chamada rac, está envolvida na activação do complexo enzimático responsável pela explosão respiratória. A activação do Fc γ R activa a rac, enquanto que a ligação do CR3, embora active outras GTPases da mesma sub-família, não activa a rac (Caron & Hall, 1998). Será de prever que muito em breve se possa esclarecer como a ligação de outros receptores de fagocitose está ligada a processos como a activação de mecanismos anti-microbianos do macrófago, a indução da produção de determinadas citoquinas ou a regulação do processo de maturação do fagossoma formado (discutido abaixo). Confirmar-se-á então ou não a hipótese de que as probabilidades de uma bactéria sobreviver no interior do macrófago, assim como o nicho que irá ocupar no caso de sobreviver, dependem do tipo de receptor envolvido na sua fagocitose. A complexidade desta matéria é no entanto grande, já que, como foi dito acima, a internalização de uma bactéria, como o *M. avium*, envolve provavelmente, a interacção entre inúmeros ligandos na sua superfície e outros tantos receptores à superfície do macrófago. O

resultado final da ligação de uma partícula, vai ser portanto o resultado da integração das informações dadas por cada um dos receptores. Há ainda que considerar que, por um lado, a presença de opsoninas depende do local em que se dá a fagocitose e por outro, a expressão de muitos dos receptores em causa depende do grau de diferenciação e activação do macrófago. Assim, na circulação sanguínea poderão estar presentes fragmentos do complemento e anticorpos, que opsonizam a bactéria e a tornam reconhecível pelos FcR e pelos CR. Nos alvéolos pulmonares, pelo contrário, praticamente não há soro, logo estas moléculas não estão presentes. Poderão então ter mais importância os receptores de tipo "scavenger" ou o receptor de manose-fucose. Proteínas presentes no surfactante pulmonar poderão ter algum efeito opsónico, embora não seja claro se aumentam ou não a internalização de micobactérias pelos macrófagos alveolares (Ernst, 1998, Stokes et al, 1998). Durante a diferenciação dos monócitos para macrófagos, a expressão de CR3 diminui, enquanto aumenta a de CR4, de receptor de manose-fucose e de "scavenger receptors" (Ernst, 1998). A activação dos macrófagos com IFN γ leva à diminuição da expressão do receptor de manose-fucose (Schreiber et al, 1993), enquanto que a infecção com *M. bovis* BCG ou o LPS aumentam a expressão de "scavenger receptor" (van der Laan, 1999). Será portanto de admitir que as diferenças de capacidade anti-microbiana dos macrófagos nos seus diversos estadios de diferenciação ou activação começam logo no primeiro passo da sua interacção com o microrganismo- o reconhecimento, a adesão e a internalização.

O objectivo da fagocitose por parte do macrófago é a destruição da partícula ou célula ingerida no seu interior. Com esse fim, o fagossoma sofre, após a sua formação, um processo a que se chama maturação. Este processo consiste numa série de alterações, quer na composição da sua membrana, quer do seu conteúdo, que culminam na

fusão com os lisossomas pré-formados no macrófago. Os lisossomas são vesículas cujo conteúdo é ácido (pH cerca de 5) e contêm no seu interior várias enzimas hidrolíticas cuja actividade é óptima precisamente a pH baixo. A fusão entre os fagossomas e os lisossomas põe em contacto o material ingerido com enzimas hidrolíticas que fazem a sua digestão. Embora não seja completamente claro o mecanismo pelo qual se dá o processo de maturação, é de admitir que ela resulta de sucessivos processos de fusão parcial dos fagossomas com outros compartimentos do sistema endossomal do macrófago (Desjardins, 1995). A composição da membrana do fagossoma logo após a sua formação é a mesma da membrana plasmática que lhe deu origem. Assim, encontram-se na membrana de um fagossoma recém-formado os próprios receptores de fagocitose, moléculas do MHC, classe I e classe II, receptor da transferrina, etc (Pitt et al, 1992, Berón et al, 1995, Desjardins, 1995). À medida que se dá o processo de maturação, vai havendo uma remodelação da composição dessa membrana. As proteínas referidas acima desaparecem progressivamente e aparecem outras, algumas das quais estão envolvidas em processos de fusão, como é o caso das anexinas e das proteínas rab (Desjardins et al, 1994a, Desjardins et al, 1994b). Os endossomas precoces e também os fagossomas recém-formados, expressam rab 5 (Zerial & Stenmark, 1993, Desjardins et al, 1994a, Desjardins, 1995), enquanto as membranas dos compartimentos tipo endossoma tardio ou pré-lisossoma expressam a rab 7 (Zerial & Stenmark, 1993, Desjardins et al, 1994a, Desjardins, 1995). Nesta mesma fase, é também expresso o receptor da manose-6-fosfato (M-6-PR), envolvido no transporte de enzimas lisossomais (Berón et al, 1995, Pitt et al, 1992). Durante a maturação do fagossoma, também a composição fosfolipídica da membrana é alterada, tornando-se progressivamente mais semelhante à dos lisossomas (Desjardins et al,

1994b). Finalmente, o fagossoma funde com os lisossomas, adquirindo algumas proteínas presentes nas suas membranas, como as proteínas LAMP 1 e LAMP 2 (Berón et al, 1995, Pitt et al, 1992, Desjardins et al, 1995). No interior do fagolisossoma, resultante do processo de fusão, passam a estar presentes as enzimas hidrolíticas transportadas pelos lisossomas, nomeadamente catepsina D e β -glucuronidase (Pitt et al, 1992). Outro aspecto importante da maturação do fagossoma é a progressiva acidificação do seu interior. Esta acidificação é resultado da actividade de uma ATPase ligada a uma bomba de prótons que se insere na membrana do fagossoma (Pitt, 1992, Grinstein et al, 1992).

Desde os estudos pioneiros de Hart e colaboradores, nos anos 70, têm-se acumulado evidências de que os fagossomas que contêm micobactérias virulentas viáveis no interior dos macrófagos não fundem com lisossomas. Os fagossomas que contêm as mesmas espécies de micobactérias, mas previamente mortas, maturam e fundem com lisossomas, de forma semelhante à que acontece com partículas inertes (Armstrong & Hart, 1975, Frehel et al, 1986, Sibley et al, 1987). Trabalhos de caracterização molecular desses fagossomas têm confirmado a inibição do processo de maturação, revelada pela expressão de níveis baixos das moléculas consideradas como marcadores de endossomas tardios ou lisossomas, como LAMP1, LAMP2, CD63 e rab7. Pelo contrário, os fagossomas que contêm *M. tuberculosis* e *M. avium* têm na sua membrana moléculas típicas de um compartimento do tipo endossoma precoce, como é o caso da rab5 e do receptor da transferrina. Os vários dados parecem portanto indicar que as micobactérias habitam um compartimento do tipo endossoma precoce, no qual têm livre acesso ao ferro que é internalizado pelo receptor da transferrina (Clemens & Horwitz, 1996) e provavelmente a outros nutrientes provenientes do exterior (Russell et al, 1996). Outra

característica importante dos fagossomas que contêm o *M. avium* e o *M. tuberculosis* é o pH relativamente elevado (6.0 a 6.5). Surpreendentemente, os fagossomas macrofágicos habitados por *M. avium* e *M. tuberculosis* viáveis não expressam a bomba de prótons na sua membrana (Sturgill-Koszycki et al, 1994, Xu et al, 1994).

Julga-se que a inibição da maturação e acidificação dos fagossomas é um factor importante para a sobrevivência de estirpes virulentas de *M. avium* e *M. tuberculosis* no interior dos macrófagos. Vários estudos têm tentado relacionar a sobrevivência e o crescimento intramacrofágico do *M. avium* com o grau de maturação do fagossoma que o contém. Assim, os fagossomas que contêm o *M. avium* no interior de macrófagos que expressam o alelo que confere resistência à infecção (*Nramp1*^R), apresentam sinais de fusão mais extensa com os lisossomas do que os fagossomas presentes em macrófagos *Nramp1*^S (de Chastellier et al, 1993), mais permissivos à proliferação microbiana. Por outro lado, quando macrófagos de ratinho infectados com *M. avium* são tratados com IFN γ e LPS, um tratamento que diminui o crescimento intramacrofágico da bactéria, verifica-se um aumento da fusão dos fagossomas com lisossomas, assim como da sua acidificação (Schaible et al, 1998). Em qualquer dos estudos anteriores verificou-se uma correlação entre aumento da maturação dos fagossomas e maior capacidade bacteriostática do macrófago. No entanto, não ficou esclarecido se o aumento de bacteriostase era devido ao aumento da maturação dos fagossomas ou se, pelo contrário, a maturação mais extensa dos fagossomas resultava de uma prévia perda de viabilidade da micobactéria, induzida por outros mecanismos do macrófago. Numa experiência clássica realizada por Hart e colaboradores nos anos 70, *M. tuberculosis* foi opsonizado com anticorpos específicos, de modo a promover a sua internalização pelo receptor do fragmento Fc e

verificou-se que desta forma os fagossomas que continham a bactéria viável no interior do macrófago fundiam com lisossomas. Verificou-se também que a capacidade de crescimento das bactérias internalizadas deste modo era equivalente àquela de bactérias internalizadas sem opsonização prévia e cujos fagossomas não fundiram com lisossomas (Armstrong & Hart, 1975). Continua portanto em aberto a questão da importância da inibição da fusão fagossoma-lisossoma para a sobrevivência das micobactérias no interior do macrófago.

2. Espécies reactivas de oxigénio e azoto

Uma das formas que os macrófagos possuem de inactivar certos microrganismos é expondo-os à acção tóxica de espécies reactivas de oxigénio e azoto por eles produzidas. As enzimas macrofágicas responsáveis pela produção destas espécies são activadas por estímulos como a ligação de receptores de fagocitose, produtos microbianos ou citoquinas (Ding et al, 1988, Rotrosen, 1992). A chamada "oxidase dependente do NADPH" é um complexo enzimático presente na membrana citoplasmática dos macrófagos e outros "fagócitos profissionais", sendo incorporada nos fagossomas durante a sua formação. Este complexo enzimático cataliza a redução do oxigénio molecular pelo NADPH, dando origem ao radical superóxido (O_2^-) que assim é libertado para o exterior do macrófago ou para o interior do fagossoma. O processo foi primeiramente descrito em neutrófilos, associado à fagocitose e dado o elevado consumo de oxigénio a que dá origem, foi designado por "explosão respiratória" (Rotrosen, 1992). O radical superóxido não é muito tóxico, mas a sua reactividade aumenta em meio apolar ou em meio ácido (Klebanoff, 1992). O superóxido sofre espontânea e rapidamente uma reacção de dismutação em que dá

origem a peróxido de hidrogénio (H_2O_2), esta sim uma molécula com clara actividade anti-microbiana (Klebanoff, 1992, Forman & Thomas, 1986). Na presença de ferro, o peróxido de hidrogénio oxida o ião Fe^{2+} a Fe^{3+} , na chamada reacção de Fenton, produzindo o radical hidroxilo (Forman & Thomas, 1986). Também o próprio radical superóxido pode reagir com o ferro segundo a chamada reacção de Haber-Weiss, dando igualmente origem ao radical hidroxilo (Beckman et al, 1990). Tanto o peróxido de hidrogénio como o radical superóxido podem reagir com monóxido de azoto, para dar origem a peroxinitrito (Beckman et al, 1990, Fang, 1997). Por outro lado, o peróxido de hidrogénio pode reagir com iões haleto, dando origem a compostos como o ácido hipocloroso, que têm elevada toxicidade. Esta reacção é catalisada por enzimas peroxidases, nomeadamente a mieloperoxidase (MPO) presente nos neutrófilos e nos monócitos. Os macrófagos residentes nos tecidos não expressam, no entanto, MPO (Klebanoff, 1992, Forman & Thomas, 1986). A capacidade de macrófagos activados com citocinas inibirem o crescimento de parasitas intracelulares, como o *Toxoplasma gondii* (Murray & Cohn, 1980), *Leishmania donovani* (Haidaris, 1982) ou *Candida albicans* (Sasada & Johnston, 1980) depende, pelo menos em parte, da sua capacidade de produzir espécies reactivas de oxigénio.

A quantidade de radical superóxido formado durante a fagocitose do *M. avium* depende da estirpe da bactéria, sendo maior para as estirpes menos virulentas (Gangadharam & Edwards, 1984, Bermudez & Young, 1989, Sarmiento & Appelberg, 1996). Não se sabe quais são os factores bacterianos responsáveis por estas diferenças, sendo de admitir que alguns componentes da parede possam intervir, ou directamente, inibindo a actividade da oxidase responsável pela explosão respiratória, ou indirectamente, condicionando o tipo de receptor envolvido na fagocitose. Para além do processo de fagocitose, outros

estímulos que podem induzir a explosão respiratória incluem determinadas citocinas, que podem ser produzidas pelo próprio macrófago (como é o caso do $\text{TNF}\alpha$) ou por outras células do sistema imune (caso do $\text{IFN}\gamma$). A produção de $\text{TNF}\alpha$ pelo macrófago pode ser activada por produtos bacterianos, incluindo os lipoarabinomananos das micobactérias, como foi referido anteriormente (Chatterjee et al, 1992, Roach et al, 1993). No caso do *M. avium*, as estirpes menos virulentas são aquelas que induzem maior produção de $\text{TNF}\alpha$ (Furney et al, 1992, Sarmiento e Appelberg, 1995), o que, pelo menos em alguns casos, poderá explicar a maior activação da oxidase dependente do NADPH e o menor crescimento no interior dos macrófagos (Sarmiento & Appelberg, 1996). A activação do macrófago com $\text{IFN}\gamma$ também activa a oxidase dependente do NADPH, aumentando a produção de espécies reactivas de oxigénio (Nathan et al, 1983). Este mecanismo é importante para a capacidade dos macrófagos activados matarem o *M. microti*, uma micobactéria não patogénica para o Homem (Walker & Lowrie, 1981). O tratamento com $\text{IFN}\gamma$ também causa a inibição do crescimento do *M. avium*, do *M. tuberculosis* e do *M. bovis* no interior do macrófago. Contudo, no caso destas espécies patogénicas de micobactérias, o efeito bacteriostático do $\text{IFN}\gamma$ não depende da produção de espécies reactivas de oxigénio (Appelberg & Orme, 1993, Chan et al, 1992, Flesch & Kaufmann, 1991). De um modo geral, as estirpes mais virulentas de *M. avium*, à semelhança do *M. tuberculosis*, são muito resistentes aos efeitos tóxicos das espécies reactivas de oxigénio (Gangadharam & Pratt, 1984, O'Brien et al, 1991, Sherman et al, 1995). Não se sabe exactamente quais os mecanismos moleculares responsáveis por esta resistência. Estas micobactérias (ao contrário da espécie não patogénica *M. smegmatis*) não possuem a proteína reguladora *oxyR*, que regula a resposta ao stress oxidativo nas bactérias Gram negativo (Sherman et al, 1995). Embora

algumas estirpes de *M. avium* e *M. tuberculosis* produzam catalase, não é clara a relação entre esta produção e a resistência às espécies reactivas de oxigénio produzidas pelo macrófago (Gangadharam & Pratt, 1984, O'Brien et al, 1991). Sabe-se, no entanto, que o *M. avium* sintetiza uma enzima dismutase do superóxido de 23 kDa, capaz de inactivar o superóxido produzido pelo macrófago e também uma proteína de choque térmico de 65kDa capaz de inibir a sua produção (Inderlied, 1993). A maior defesa das micobactérias patogénicas contra os efeitos das espécies reactivas de oxigénio talvez seja, no entanto, a constituição da sua parede. A parede das micobactérias de espécies patogénicas contém glicolípidos fenólicos e ácidos gordos ciclopropanados, que são capazes de neutralizar radicais de oxigénio (Chan et al, 1989, Yuan et al, 1995).

Recentemente, foram gerados ratinhos geneticamente deficientes na oxidase dependente do NADPH (Jackson et al, 1995) e aguardam-se os resultados da sua infecção por *M. avium* para ter uma resposta definitiva sobre a importância deste mecanismo no controlo do crescimento do *M. avium* exercido pelo macrófago. É no entanto significativo que doentes humanos com deficiências genéticas no complexo enzimático da oxidase dependente do NADPH (Doença Crónica Granulomatosa), embora tenham infecções recorrentes por vários tipos de bactérias e por fungos, raramente têm infecções por micobactérias (Ohga et al, 1997). Este facto sugere que a produção de espécies reactivas de oxigénio não é um factor determinante para a capacidade do hospedeiro conter infecções por espécies patogénicas de micobactérias.

A via metabólica que permite ao macrófago a produção do radical monóxido de azoto foi descrita mais recentemente. Só no início dos anos

80 foi descoberta a capacidade de células de mamífero produzirem sais inorgânicos de azoto, nomeadamente nitrato e nitrito (Green et al, 1981, Stuehr & Marletta, 1985). Esta produção depende da oxidação enzimática do aminoácido L-arginina, numa reacção em que se produz monóxido de azoto (NO) e L-citrulina (Palmer et al, 1988, Marletta et al, 1988). O monóxido de azoto é uma molécula instável, que rapidamente é oxidada a nitrito e nitrato, as formas em que é excretado. Foram descritas até hoje 3 isoformas da enzima responsável pela produção do NO, a sintase do monóxido de azoto (NOS). Duas destas isoformas, descobertas em primeiro lugar respectivamente no endotélio e nos neurónios, são expressas constitutivamente. A sua actividade é dependente da elevação do nível intracelular de cálcio e catalisa a produção de baixas concentrações de NO, por curtos períodos de tempo. O NO produzido por estas enzimas serve de mediador local, estando envolvido em diversos efeitos biológicos, como a neurotransmissão, o peristaltismo ou a regulação da pressão sanguínea (Nathan & Xie, 1994). A isoforma que é expressa nos macrófagos (designada NOS II ou iNOS), pelo contrário, caracteriza-se pelo facto de a sua transcrição ser indutível por estímulos extra-celulares e por produzir grandes quantidades de óxidos de azoto de forma independente da elevação do nível intracelular de cálcio (Nathan & Xie, 1994; Xie and Nathan, 1994). Os primeiros estímulos descritos como activadores da produção de NO pelo macrófago foram o LPS bacteriano, a infecção por *M. bovis* BCG e o IFN γ (Stuehr & Marletta, 1985, Stuehr & Marletta, 1987, Ding et al, 1988). Posteriormente, o estudo da região promotora do gene da iNOS revelou uma estrutura complexa, sendo muito numerosos os factores de transcrição capazes de regular a sua expressão. Para além das regiões envolvidas na indução por IFN γ (Martin et al, 1994) e de um local de ligação do factor de transcrição NF- κ B, que poderá estar

envolvido na activação por LPS, IL-1 e TNF α (Xie et al, 1992, Chan et al, 1999), está também descrita uma região (Hypoxia Responsive Element, ou HRE) que liga um factor citoplasmático activado em situações de hipóxia (Melillo et al, 1995). Curiosamente, o tratamento dos macrófagos com o quelante do ferro desferroxamina ou com o metabolito do triptofano, ácido picolínico, também leva à activação do HRE e consequente aumento da transcrição do gene da iNOS, em macrófagos simultaneamente activados com IFN γ (Melillo et al, 1997). O primeiro efeito biológico atribuído ao NO produzido indutivelmente pelo macrófago foi a actividade anti-tumoral (Hibbs et al, 1987). O paralelismo entre os estímulos que levam ao aumento da expressão da iNOS e aqueles que aumentam a actividade anti-microbiana do macrófago, assim como a conhecida acção antibacteriana dos nitritos, sugeriram no entanto que o NO formado por acção da iNOS no macrófago poderia também ter um papel na actividade anti-microbiana dessa célula. Esta suspeita veio a confirmar-se em experiências em que se verificou que a actividade antimicrobiana de macrófagos activados com citoquinas era dependente da presença de arginina no meio e reduzida pela presença de inibidores da iNOS. Estes resultados foram obtidos com parasitas tão diversos como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans* ou *Schistosoma mansoni* (revisto em Nathan and Hibbs, 1991 e Fang, 1997). Mais recentemente, foram gerados por recombinação homóloga ratinhos geneticamente deficientes na expressão da iNOS e verificou-se que estes animais têm susceptibilidade aumentada em relação a infecções por *Leishmania major* (Wei et al, 1995), *Listeria monocytogenes* (MacMicking et al, 1995), infecção crónica por *Toxoplasma gondii* (Scharton-Kersten et al, 1997) e também à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (MacMicking et al, 1997). No caso do

M. avium, o papel do NO não está esclarecido. Ao estudar a sua interacção com macrófagos derivados da medula óssea *in vitro*, Appelberg e colaboradores viram que o crescimento de uma grande variedade de estirpes de *M. avium* foi inibido quando os macrófagos foram tratados com IFN γ e/ou TNF α . Contudo, esta restrição do crescimento não foi revertida pelo inibidor da iNOS N^G-monometil-L-arginina (NMMA) (Appelberg & Orme, 1993). O *M. avium* e o *M. intracellulare* são consideravelmente mais resistentes ao nitrito e nitrato gerados *in vitro* do que o *M. tuberculosis*, sem que se saiba a razão destas diferenças (Sato et al, 1992, Doi et al, 1993, O'Brien et al, 1994, Rhoades & Orme, 1997).

Um dos primeiros efeitos atribuídos ao NO no contexto da sua acção anti-tumoral foi a inactivação de enzimas contendo grupos Fe-S, nomeadamente a aconitase mitocondrial, envolvida no ciclo de Krebs, assim como o efluxo de ferro das células-alvo (Drapier & Hibbs, 1988). Mais recentemente, foram reveladas várias inter-relações entre a produção de NO e o metabolismo do ferro no macrófago (Hentze & Kuhn, 1996), como será discutido mais adiante.

3. Retenção de ferro e degradação do triptofano

Praticamente todos os organismos necessitam de ferro para viver. Assim, parece ser uma boa estratégia de defesa contra infecções a restrição do acesso ao ferro por parte dos agentes infecciosos. Um conjunto de mecanismos existe de facto em todos os mamíferos para chegar a esse fim. Em situações de infecção, são libertadas para a circulação as citoquinas IL-1, IL-6 e TNF α que, entre outros, têm os efeitos seguintes (Weinberg, 1992): supressão da absorção intestinal de ferro, retenção pelos macrófagos do ferro resultante da digestão de

eritrócitos fagocitados, aumento da síntese de ferritina, mobilização dos neutrófilos para os locais de infecção, com libertação de apo-lactoferrina dos seus grânulos, ligação do ferro pela apo-lactoferrina e ingestão da ferri-lactoferrina pelos macrófagos, síntese de anticorpos contra componentes dos agentes infecciosos envolvidos na captação de ferro. Estes sistemas parecem ter evoluído para restringir o acesso ao ferro de agentes infecciosos extra-celulares, contra os quais têm actividade inibitória eficaz. Não é tão claro, no entanto, como é que o macrófago poderá restringir o acesso ao ferro dos microrganismos que habitam no seu interior.

As primeiras evidências de que a activação do macrófago com IFN γ leva à restrição do acesso ao ferro por microrganismos intracelulares vieram de estudos feitos com *Legionella pneumophila*. O crescimento da *L. pneumophila* dentro de macrófagos humanos diminui quando se adiciona o quelante de ferro desferroxamina (DFO) ou IFN γ . Em ambos os casos, o efeito é revertido pela adição de ferro. O tratamento com IFN γ leva à diminuição da expressão de receptores para a transferrina à superfície do macrófago, o que poderá explicar, pelo menos em parte, a menor disponibilidade de ferro para a bactéria (Byrd & Horwitz, 1989). Resultados semelhantes (diminuição do crescimento com DFO ou IFN γ , reversão pela adição de ferro) foram obtidos com macrófagos peritoneais de ratinho, quer com *L. pneumophila* (Gebran et al, 1994a) quer com o fungo *Histoplasma capsulatum* (Lane et al, 1991). A importância do acesso ao ferro para o crescimento intramacrofágico da *L. pneumophila* também é evidente na observação de que os macrófagos residentes peritoneais de ratinho não permitem o crescimento intracelular desta bactéria, enquanto que o contrário acontece com macrófagos inflamatórios, chamados com tioglicolato. Estes últimos têm maior expressão de receptores de transferrina à

superfície e maior conteúdo em ferro total do que os primeiros (Gebran et al, 1994b). O crescimento da *Listeria monocytogenes* no interior de macrófagos peritoneais de ratinho também depende da quantidade de ferro intracelular e da expressão de receptores de transferrina, embora no caso desta bactéria haja outros factores a contribuir para o crescimento ou não no interior dos macrófagos (Alford et al, 1991). A capacidade de inibir o crescimento intracelular de microrganismos por mecanismos que envolvem a restrição do ferro não é exclusiva dos macrófagos. A activação de enterócitos com $\text{IFN}\gamma$ leva à restrição do crescimento intracelular do protozoário *Toxoplasma gondii*, sendo esta restrição de crescimento revertida pela adição de ferro. Neste sistema, não há formação de radicais de azoto e a adição de NMMA ou de "scavengers" de oxigénio não inibe a acção toxoplasmastática do $\text{IFN}\gamma$ (Dimier & Bout, 1998). Tal como foi dito atrás, o efeito tóxico do radical NO nas células-alvo passa pela remoção do ferro de grupos Fe-S em determinadas enzimas. Assim, macrófagos de ratinho infectados com *Leishmania spp*, inibem o seu crescimento intracelular quando activados com $\text{IFN}\gamma$, numa forma dependente da produção de NO. O efeito inibitório do $\text{IFN}\gamma$ pode no entanto ser revertido pela adição de ferro, sugerindo que a acção do NO poderá passar pela ligação a este metal (Mauël et al, 1991).

O metabolismo do ferro e a produção de NO parecem estar fortemente interligados nos macrófagos. Drapier & Hibbs (1988) verificaram que a activação de macrófagos com $\text{IFN}\gamma$ + LPS levava a um aumento da libertação de ferro, não só por células tumorais-alvo, mas também pelo próprio macrófago, num efeito revertido pelo NMMA. Em células não macrofágicas, a regulação do metabolismo do ferro é feita por duas proteínas citoplasmáticas, designadas IRP (Iron Regulatory Proteins ou proteínas reguladoras do ferro). As IRP

regulam a tradução de vários genes cujo mRNA contém regiões designadas IRE (Iron Responsive Elements, ou elementos sensíveis ao ferro). Alguns dos mRNAs que têm estas sequências são os das cadeias L e H da ferritina e o do receptor da transferrina. As IRP ligam os IRE quando o nível de ferro no citoplasma da célula é baixo. Em consequência dessa ligação, a tradução do mRNA para a ferritina é impedida, enquanto que o mRNA do receptor da transferrina é estabilizado, aumentando o nível de expressão desta proteína. Desta forma, uma célula com um nível baixo de ferro pode aumentar a sua aquisição pela via da transferrina. Quando o nível de ferro presente no citoplasma da célula é elevado, as IRP perdem a capacidade de ligar os IRE, permitindo a tradução das cadeias de ferritina, enquanto que o mRNA do receptor de transferrina é degradado mais rapidamente. Assim, a célula diminui a internalização de ferro e aumenta a capacidade de armazenar aquele que possui (Hentze & Kuhn, 1996). Os primeiros estudos feitos em macrófagos indicaram que o NO produzido após estimulação com IFN γ + LPS, aumentava a actividade da IRP-1, a primeira das IRP a ser caracterizada (Drapier et al, 1993, Weiss et al, 1993, Pantopoulos & Hentze, 1995). Estes resultados eram os esperados, uma vez que a IRP-1 possui um núcleo cúbico [4Fe-4S] envolvido na regulação da sua actividade pelo ferro. A falta de ferro na célula provoca a dissociação deste grupo e consequente activação da IRP para se ligar aos IRE (Hentze & Kühn, 1996). Este é um grupo que constitui um alvo típico do NO e que portanto poderá ser por ele dissociado. Por outro lado, o NO poderia estar a activar a IRP, indirectamente, por fomentar a excreção de ferro pelo macrófago e assim diminuir o nível de ferro da célula. No entanto, estes resultados não estavam de acordo com alguns efeitos conhecidos do IFN γ e outras citocinas sobre o macrófago, nomeadamente a diminuição da expressão do receptor da

transferrina (referido atrás como envolvido no mecanismo inibitório do IFN γ sobre a *L. pneumophila*) e o aumento da síntese de ferritina, um dos mecanismos de retenção de ferro visto em situações de inflamação. Assim, apesar do tratamento com IFN γ +LPS provocar activação da IRP-1, o nível de expressão do receptor de transferrina à superfície do macrófago, assim como a quantidade de mRNA para essa proteína diminuem (Pantopoulos & Hentze, 1995, Weiss et al, 1997, Recalcati et al, 1998). Pelo contrário, a expressão de ferritina aumenta quando os macrófagos são tratados com IFN γ +LPS (Recalcati et al, 1998), embora aumente mais ainda se fôr inibida a produção de NO, indicando que este radical está a exercer um efeito inibitório (Weiss, 1993). Esta inversão dos resultados esperados quanto à regulação da tradução dos genes da ferritina e do receptor da transferrina pelo NO parece ser devida à regulação da actividade da mais recentemente descrita IRP-2 que, ao contrário da IRP-1, é inibida pelo tratamento com IFN γ +LPS ou com compostos geradores de NO (Bouton et al, 1998, Recalcati et al, 1998). Outro dado que aponta para uma regulação diferencial da IRP-1 e da IRP-2 é o facto de o H₂O₂ activar a IRP-1, mas não a IRP-2 (Hentze & Kühn, 1996). Por outro lado, o tratamento com IFN γ +LPS também tem efeitos ao nível da transcrição, aumentando o nível de mRNA para a ferritina, numa forma independente da produção de NO (Weiss, 1993, Recalcati et al, 1998).

Não só o radical NO regula o metabolismo do ferro no macrófago, mas também o nível de ferro da célula influencia a produção de NO. A adição de DFO a macrófagos tratados com IFN γ +LPS, aumenta a síntese de iNOS (provavelmente, tal como foi dito atrás, pela activação do "hypoxia responsive element" no gene da iNOS). O excesso de ferro, pelo contrário, inibe a expressão da iNOS (Weiss et al, 1994).

Um outro efeito do IFN γ sobre o metabolismo do ferro no macrófago é o aumento da síntese da transferrina. Os macrófagos de ratinho, ao contrário dos humanos, têm a capacidade de sintetizar transferrina, de forma indutível pelo IFN γ . Esta transferrina é libertada pelo macrófago, associada a ferro e poderá ser importante para fornecer este metal a células T nos locais de inflamação (Djeha et al, 1992).

O crescimento do *M. avium* em ratinhos é maior em situações de excesso de ferro (Dhople et al, 1996), sugerindo que nesta situação há uma diminuição da eficácia dos mecanismos de controlo do crescimento da bactéria. Por outro lado, a presença de apo-transferrina (que diminui a disponibilidade de ferro) no meio de cultura de macrófagos humanos inibe o crescimento intramacrofágico do *M. avium* (Douvas, 1993). Estes dados indicam que a regulação do acesso ao ferro poderá ser um factor importante na interacção entre o *M. avium* e o macrófago.

A velocidade de degradação do amino-ácido triptofano é aumentada pelo IFN γ , quer em macrófagos, quer noutros tipos de células, pela activação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) (Takikawa et al, 1988). Alguns dados parecem indicar que este é um mecanismo de limitação do crescimento intracelular de determinados parasitas, que necessitariam deste amino-ácido para crescer. Fibroblastos ou macrófagos tratados com IFN γ diminuem o crescimento intracelular de *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Chlamydia psittaci*, de forma reversível pela adição de triptofano (Pfefferkorn, 1984, Murray et al, 1989, Mehta et al, 1998). Células geneticamente deficientes na enzima IDO são menos eficazes na inibição do crescimento de *T. gondii* e *Chlamydia spp* em resposta ao IFN γ (Thomas et al, 1993, Beatty et al, 1994), enquanto que células em que a IDO é induzida por mecanismos independentes do IFN γ tornam-se também mais capazes de controlar o

crescimento intracelular dos mesmos microrganismos (Gupta et al, 1994). Recentemente, estas observações foram estendidas aos vírus. Células do epitélio da retina inibem a replicação do citomegalovírus quando activadas por IFN γ . Esta inibição causa o aumento da expressão da enzima IDO. O efeito inibitório sobre a replicação do vírus é revertido pela adição de triptofano (Bodaghi et al 1999).

A degradação do triptofano poderá ainda contribuir para o efeito antimicrobiano induzido pelo IFN γ no macrófago por uma via diferente da simples deprivação do amino-ácido. De facto, um dos metabolitos do triptofano, o ácido picolínico, poderá ter efeitos biológicos extremamente importantes no macrófago infectado. O ácido picolínico tem acção sinérgica com o IFN γ no aumento da actividade anti-tumoral do macrófago (Varesio et al, 1990). A sua acção poderá resultar em parte da activação da iNOS, já que como foi referido anteriormente o ácido picolínico é capaz de activar o HRE no gene da iNOS (Varesio et al, 1990, Melillo et al, 1993). Em macrófagos de ratinho, o ácido picolínico tem acção sinérgica com o IFN γ na inibição do crescimento intracelular do *M. avium*. Nos mesmos macrófagos, a inibição do crescimento causada pelo IFN γ não é revertida por adição de triptofano (Teresa F. Pais & Rui Appelberg, 1997).

4. O gene *Nramp1*

O gene *Nramp1* (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1) foi identificado por localização cromossómica numa zona do cromossoma 1 do ratinho, conhecida anteriormente por locus *Ity / Lsh / Bcg* (Vidal et al, 1993). O locus *Ity / Lsh / Bcg* determina a resistência de diferentes estirpes de ratinho a uma série de infecções intracelulares,

nomeadamente por *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* e várias espécies de micobactérias, conforme é conhecido há várias décadas. Existe em dois alelos, chamados resistente (r, o alelo dominante) ou susceptível (s, recessivo). A diferença de susceptibilidades entre ratinhos r e s é evidente desde fases muito precoces da infecção, indicando que está relacionada com componentes da resposta inata. De facto, vários estudos, feitos quer antes quer após o seu isolamento, acabaram por concluir que o gene *Bcg / Nramp1* é expresso exclusivamente em macrófagos (Vidal et al, 1993, Schurr et al, 1991). Antes do isolamento e caracterização do gene *Nramp1*, várias tentativas foram feitas no sentido de esclarecer quais eram os mecanismos pelos quais ele conferia protecção. Assim, alguns estudos indicaram existir uma maior produção de TNF α e de espécies reactivas de oxigénio e azoto pelos macrófagos *Bcg*^r, em comparação com os *Bcg*^s (Wakelin & Blackwell, 1993, Formica et al, 1994). Em macrófagos infectados com *M. avium* não foi no entanto encontrada uma correlação entre o alelo do gene *Bcg* expresso e a produção de radicais de oxigénio (Stokes et al, 1986, Appelberg & Sarmiento, 1990). A expressão de moléculas do MHC classe II parece ser mais elevada em macrófagos resistentes (Wakelin & Blackwell, 1993). de Chastellier et al (1993) viram que em macrófagos resistentes havia maior fusão dos fagossomas contendo *M. avium* com os lisossomas do que nos macrófagos susceptíveis.

O isolamento e sequenciação do gene *Nramp1* revelou que ele codifica uma proteína transmembranar, com homologia com proteínas de transporte (Vidal et al, 1993). A proteína contém 12 domínios transmembranares. A susceptibilidade de diferentes estirpes de ratinho a infecções intracelulares correlaciona-se com uma mutação num aminoácido no 4º domínio transmembranar: uma substituição de glicina por

ácido aspártico (G169D) (Vidal et al, 1993). Ratinhos em que o gene *Nramp1* é inativado exibem um fenótipo idêntico a ratinhos portadores do alelo D169 do mesmo gene, sugerindo que este alelo é de facto não funcional (Vidal et al, 1995).

A proteína codificada pelo gene *Nramp1* é recrutada para a membrana dos fagossomas durante a sua formação e permanece nela durante o processo de maturação. É possível encontrá-la na membrana de endossomas tardios e lisossomas, co-localizando com a proteína LAMP-1 (Atkinson et al, 1997, Gruenheid et al, 1997, Searle et al, 1998). A expressão da proteína codificada pelo gene *Nramp1* é bastante inferior em macrófagos *Nramp1*^{D169}, do que em macrófagos *Nramp1*^{G169} (Vidal et al, 1996, Searle et al, 1998). A expressão do gene *Nramp1* é aumentada pelo tratamento dos macrófagos com IFN γ + LPS e também pela adição do quelante de ferro DFO (Govoni et al, 1997, Atkinson et al, 1997, Searle et al, 1998).

Sabendo que a proteína codificada pelo gene *Nramp1* é uma proteína de transporte, localizada nas membranas das vesículas que contêm os parasitas intracelulares no interior dos macrófagos, está por esclarecer qual é o substrato por ela transportado. Pistas importantes para elucidar esta questão provêm do isolamento recente de várias proteínas homólogas da proteína NRAMP1. O gene *Nramp2* foi isolado quer no Homem quer no ratinho e no rato. Ao contrário do *Nramp1*, o *Nramp2* é expresso numa grande variedade de tecidos e células. Ratinhos ou ratos com mutação espontânea do gene *Nramp2* exibem anemia microcítica (Fleming et al, 1997, Fleming et al, 1998). No rato, o gene *Nramp2* foi anteriormente designado *DCT1* e isolado a partir de células do endotélio intestinal, onde a sua expressão é aumentada quando os animais são alimentados com dieta pobre em ferro. Quando transferido para oócitos de *Xenopus*, este gene confere a essas células

maior capacidade de internalizarem ferro (Gunshin et al, 1997). O *DCT1* tem 73% de homologia com o gene *Nramp1* e 92% com o *Nramp2* humanos (Gunshin et al, 1997). A expressão do gene *Nramp1* em células não macrofágicas teve como resultado uma diminuição do ferro intracelular nessas células (Atkinson & Barton, 1998). São portanto fortes os indícios de que a proteína NRAMP1 esteja envolvida no transporte de ferro através das membranas dos fagossomas que contêm microrganismos intracelulares no interior do macrófago, embora não haja ainda uma prova de que assim é. Por outro lado, dois genes de leveduras, com grande homologia com o gene *Nramp2*, estão envolvidos no transporte de Mn^{2+} (Pinner et al, 1997), não sendo portanto de excluir que o *Nramp1* também tenha essa função.

Capítulo IV

Definição de objectivos e estratégias

O objectivo geral dos trabalhos descritos nesta tese foi o de entender quais dos potenciais mecanismos anti-microbianos do macrófago, descritos no capítulo anterior, são de facto relevantes no combate da infecção por *M. avium* no modelo murino.

Com vista ao cumprimento deste objectivo geral, algumas perguntas concretas foram feitas:

1. Será a inibição da acidificação e fusão dos fagossomas um mecanismo fundamental para a sobrevivência do *M. avium* no interior do macrófago? Será que o efeito micobacteriostático do IFN γ depende de uma aumento da acidificação e fusão dos fagossomas com lisossomas?

Os trabalhos conduzidos com o fim de responder a estas questões são descritos no capítulo V. Foi usado um modelo de infecção in vitro, em macrófagos derivados da medula óssea (BMM \emptyset) de ratinho. Este tipo de macrófagos foi o escolhido por apresentar várias vantagens em relação a outros tipos de macrófagos correntemente usados, como os peritoneais, quer residentes, quer inflamatórios: é possível obtê-los em grandes quantidades a partir de cada animal; o seu comportamento é bastante reprodutível, uma vez que não depende de prévias exposições do animal a diferentes estímulos antigénicos; não se introduzem efeitos devidos a estímulos flogísticos. Foi também um factor tido em conta, o facto de existir no laboratório experiência prévia com este tipo de macrófagos, incluindo o conhecimento do crescimento típico de diferentes estirpes de *M. avium* no seu interior, assim como a inibição desse crescimento por citocinas como o IFN γ e o TNF α (Appelberg & Orme, 1993, Appelberg et al, 1994a, Appelberg et al, 1995b, Pedrosa et al, 1994). Os trabalhos descritos no capítulo V-1 foram realizados na

Universidade Rockefeller, em N.Y., sob a orientação de Gilla Kaplan e Michel Rabinovitch. Fizémos uso de um segundo microrganismo, a *Coxiella burnetii*, para induzir a transferência de micobactérias para um ambiente próximo daquele que é encontrado em fagolisossomas. Esta estratégia foi baseada em trabalhos anteriores de Michel Rabinovitch e colaboradores, que indicaram que os vacúolos habitados por *C. burnetii*, de características semelhantes a fagolisossomas, tinham uma grande tendência para fundir com fagossomas (Veras et al, 1994, Veras et al, 1995, Rabinovitch & Veras, 1996, de Chastellier et al, 1995).

2. Qual é o papel do monóxido de azoto na infecção do ratinho por *M. avium*? Embora trabalhos anteriores neste e noutros laboratórios indicassem que a produção de NO não era essencial para o controlo da infecção por *M. avium*, esses trabalhos tinham sido feitos com a adição de inibidores da iNOS, logo sem a garantia de uma inibição total da sua produção, e apenas em modelos in vitro. Dispondo agora de ratinhos tornados geneticamente deficientes em iNOS por recombinação homóloga, pudémos voltar a abordar esta questão de uma forma mais eficaz. Tal como descrito no Capítulo VI, testámos o papel do NO no efeito micobacteriostático do IFN γ e do TNF α contra várias estirpes de *M. avium* em BMM \emptyset e também no curso de uma infecção in vivo. Todas as infecções in vivo descritas nesta tese foram feitas pela via intravenosa com 10⁶ CFUs de *M. avium*, segundo protocolos para os quais existe grande experiência no laboratório e que dão origem a cursos de infecção também bem conhecidos (Appelberg et al, 1994a, Castro et al, 1995b).

3. Qual o papel do acesso ao ferro na sobrevivência e proliferação do *M. avium* no ratinho? Para responder a esta questão, conforme é

descrito no Capítulo VII, fizémos mais uma vez estudos quer in vitro quer in vivo, usando os métodos gerais já referidos. A depleção de ferro foi feita usando quelantes e dieta pobre em ferro, no caso dos estudos in vivo.

4. Estará a acção da proteína codificada pelo gene de resistência *Nrampl* relacionada com o acesso ao ferro? Para responder a esta questão, foram conduzidas as experiências descritas no Capítulo VIII, que envolvem a infecção in vivo de ratinhos tratados ou não com ferro-dextrano, de forma a induzir sobrecarga de ferro nos seus órgãos.

Terceira Parte
Novos achados

Capítulo V-1.

"Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages"

Maria Salomé Gomes, Simon Paul, André L. Moreira, Rui Appelberg,
Michel Rabinovitch e Gilla Kaplan

1999 Infection & Immunity. Aceite para publicação.

Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages.

Maria Salomé Gomes^{1,†}, Simon Paul¹, Andre L. Moreira¹, Rui Appelberg², Michel Rabinovitch^{1,§}, and Gilla Kaplan^{1*}

¹Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, The Rockefeller University, New York, NY

²Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Portugal

*Corresponding author:

Mailing Address:

The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021.

TEL# 212-327-8375; FAX# 212-327-8875; e-mail: kaplang@rockvax.rockefeller.edu

Present addresses:

†Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Portugal

§Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Despite the anti-microbial mechanisms of vertebrate phagocytes, mycobacteria can survive within the phagosomes of these cells. These organisms use various strategies to evade destruction including inhibition of acidification of the phagosome and inhibition of phagosome-lysosome fusion. In contrast to mycobacteria, *Coxiella burnetii*, the etiologic agent of Q fever, inhabits a spacious acidified intracellular vacuole which is prone to fusion with other vacuoles of the host cell, including phagosomes containing mycobacteria. The *Coxiella* infected cell thus provides a unique model in which to investigate the survival of mycobacteria in an acidified phagolysosome-like compartment. In the present study murine bone marrow derived macrophages were infected with either *M. avium* or *M. tuberculosis* and then subsequently co-infected with *C. burnetii*. We observed that the majority of phagocytosed mycobacteria co-localized to the *C. burnetii*-containing vacuole, which maintained its acidic properties. In co-infected macrophages, the growth of *M. avium* was not impaired following fusion with the acidified vacuole. In contrast, the growth rate of *M. tuberculosis* was reduced in acidified vacuoles. These results suggest that although both species of mycobacteria inhibit phagosome-lysosome fusion, they may be differentially susceptible to the toxic effects of the acidic environment in the mature phagolysosome.

INTRODUCTION

When macrophages ingest particulate material, an intracellular vacuole (phagosome) is formed which undergoes a stepwise maturation. This process consists of a progressive acidification and several fusion and fission events eventually leading to fusion with lysosomes (7,40). Ultimately, the fully mature phagosome contains enzymes and the acidic environment necessary to denature and degrade phagocytosed material (15). This pathway is an important component of the macrophage's defense against invading organisms. Thus, it is not surprising to find that successful intracellular pathogens have developed different strategies to escape the phagosomal maturation pathway. Two bacterial genera that have developed alternative strategies for their survival are mycobacteria and coxiella.

Virulent strains of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* survive and grow exponentially inside non-activated murine macrophages (3-5), despite the potent anti-microbial mechanisms of the host cell (22-24,36). Mycobacteria arrest the maturation of the early endosome to a phagolysosome by inhibiting fusion of the mycobacteria-containing phagosome with lysosomes (4,5,12,13,22,25). This is demonstrated by the observation that mycobacteria-containing phagosomes have low levels of the molecules characteristic of lysosomal membranes, including CD63, LAMP-1, LAMP-2 and the GTP-binding protein rab7, while retaining the markers of the early endocytic compartment, including the transferrin receptor and rab 5 (12,47,49). Also, *M. avium*-containing phagosomes interact extensively with endosomes, as indicated by the ready acquisition of gangliosides from the cell surface (41). Although the lysosomal acid protease cathepsin D might be present in the mycobacteria-containing phagosomes in a low amount (12) the enzyme remains in an inactive form (44).

Mycobacteria-containing phagosomes do not acidify (13,37), which may be due at least in part to the exclusion of the vacuolar proton-ATPase from the membrane (43,49). This lack of acidification is probably responsible for the failure of enzymes such as cathepsin-D to be activated. The inhibition of phagosome maturation is assumed to be an active process controlled by mycobacteria, since only viable bacilli can accomplish this (5). When murine macrophages are treated with cytokines leading to inhibition of mycobacterial growth, the arrest of maturation of the mycobacterium-containing phagosomes is overridden (3,23,24,30,42,48).

In contrast to the situation described above, *Coxiella burnetii*, the etiologic agent of Q fever, is an obligate intracellular pathogen that multiplies inside eukaryotic cells within a spacious vacuole with phagolysosome-like properties (29,32). *C. burnetii* requires an acidic environment for its multiplication: pharmacologic agents that raise phagolysosome pH inhibit the growth of *C. burnetii* (27,39). In addition, vacuoles containing *C. burnetii* are prone to fusion with other vesicles of the phagocytic/endocytic system (45,46). This fusion has been observed in bone marrow-derived macrophages (BMM) infected with *M. avium* and co-infected with *C. burnetii*. In this system progressive co-localization of the mycobacteria to the *C. burnetii*-containing phagolysosome-like vacuole was noted (17).

In the present study we used the unique mycobacteria-*C. burnetii* coinfection model to investigate whether *M. avium* or *M. tuberculosis* could survive after transfer to an acidified phagosome-like vacuole. We report here that in murine BMM infected with *M. avium* (strain 25291) and later co-infected with *C. burnetii* (Nine Mile strain) the co-localization of mycobacteria in the acidified, *C. burnetii*-containing phagosome-like vacuole did not affect *M. avium* growth. In contrast, co-

localization of *M. tuberculosis* strain H37Rv in the acidified vacuole of *C. burnetii*-infected cells impaired the growth of the tubercle bacillus.

MATERIAL AND METHODS

Macrophage culture: BMM were prepared as follows: The femurs of C57BL/6 mice were flushed with Hank's balanced salt solution (HBSS) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) to obtain the bone marrow. Cells were washed once in HBSS, resuspended in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10 % fetal calf serum (GIBCO) and 10% L929 cell-conditioned medium (LCCM) as source of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (Complete medium), plated in tissue culture dishes and incubated at 37°C overnight. Adherent cells (mature macrophages and fibroblasts) were discarded; non-adherent cells were collected and washed once with HBSS, and resuspended in complete medium. Either 5×10^5 cells were seeded per well in a 24 well plate (Falcon, Becton and Dickinson, Lincoln Park, NJ) for colony forming units assay and fluorescence microscopy (see below) or 3.5×10^6 cells were seeded per well in 6 well plates (for electron microscopy). 10% LCMM was added to the culture on day 3 and 6 of culture. Cells were used for infection at day 9 of culture.

Bacteria: *Mycobacterium avium*, strain 25291 (ATCC, Rockville, MD) and *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv (Trudeau Institute, Saranac Lake, NY) were cultivated in Middlebrook 7H9 medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 0.04% Tween 80 (Sigma, St Louis, MI). The bacteria were harvested in mid-log phase, washed, resuspended in saline and kept frozen (-80°C) in aliquots until use. Before infection the mycobacterial aliquots were probe sonicated as described (38) to disperse clumps. Phase II *Coxiella burnetii*, Nine Mile strain, was provided by Dr T. Hackstadt, Rocky Mountain Laboratories (Hamilton, MT). The phase II variant of *C. burnetii* (truncated lipopolysaccharide) is avirulent to humans and easily phagocytosed by

mononuclear phagocytes (28). *C. burnetii* was propagated in Vero cells (African green monkey kidney fibroblasts, ATCC). Heavily infected Vero cells were scraped off the culture plates and lysed by passing the cell suspension one hundred times through a 26 gauge needle. This suspension was centrifuged at 630g to eliminate cell debris and then at 22000g to pellet the bacteria. Highly enriched *C. burnetii* lysates were resuspended in RPMI 1640 medium in aliquots and kept frozen at -80°C until use.

Infections: Nine day old BMM were infected with *M. avium* or *M. tuberculosis* at a multiplicity of infection of eight mycobacteria per cell (*M. avium*) or one mycobacterium per cell (*M. tuberculosis*). After a 4h incubation, cells were washed with warm HBSS to remove non-internalized organisms and maintained in fresh culture medium. Four days after mycobacterial infection, cell monolayers were co-infected for 4h with *C. burnetii*-enriched cell lysates and washed. Cultures were followed for three more days.

Colony forming units (CFU) assay: At different time points after infection, the BMM monolayer was disrupted with a solution of water containing 0.04% tween 80 and 0.008% digitonin (Sigma). Bacterial suspensions were serially diluted and plated onto Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with OADC enrichment (Difco). Plates were incubated for 7 to 10 days at 37°C. Colonies were counted under a dissecting microscope and reported as CFU. Growth rates of the mycobacteria were calculated using the formula: $g = 0.69t / \ln M - \ln M_i$. M = number of bacilli at the end of the study, M_i = number of bacilli at the start of the study and t = study time.

Fluorescence microscopy: BMM were cultured on 12mm glass coverslips placed in 24 well plates. At 24h intervals following infection, monolayers were fixed in periodate-lysine-paraformaldehyde and double stained with DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole hydrochloride; Molecular Probes Inc., Eugene, OR) for 3 min at room temperature, which stained the nuclei of the cells and the *C. burnetii* organisms, and with auramine-rhodamine acid-fast stain (Difco) which stained mycobacteria. The number of acid-fast bacilli (AFB) found inside and outside the *C. burnetii*- bearing vacuoles were then counted in 200 cells under a fluorescence microscope. Results are expressed as mean number of AFB/cell.

Electron microscopy (EM): Cells were fixed in 2% glutaraldehyde/ 0.1M sucrose/ 0.1M cacodylate buffer (Polysciences, Warrington, PA) for 1h at 4°C and processed for electron microscopy as previously described (38). For immunogold studies, cell samples were dehydrated in alcohol and embedded in LR White hard grade acrylic resin (London Resin Co., Reading, UK). Ultrathin sections were examined with a JEOL JEM 100CX transmission electron microscope.

Measurement of lysosomal acidification: The acidification of intracellular compartments was determined by the method of Anderson et al (1). Briefly, cells were incubated for 30 min with the weak base 3-(2,4-dinitroanilo)-3'-amino-N-methyl dipropylamine (DAMP) (Molecular Probes Inc), washed three times with RPMI and fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer. After incubation with an ammonium chloride solution to remove non-specifically bound DAMP, cells were scraped off the culture plates and processed for EM as described above. The ultra-thin sections were placed on EM grids and

incubated with a monoclonal anti-2,4-dinitrophenol (DNP) mouse IgG (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) for 30 min, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with gold (Auroprobe goat anti-mouse IgG, Amersham, Arlington Heights, IL). The grids were stained with uranyl and lead acetate, and examined in a transmission electron microscope as described (38).

RESULTS

Fusion of *M. avium* vacuoles with the *C. burnetii*-containing vacuole:

When murine BMM were infected with *M. avium* strain 25291, the mycobacteria localized in individual tight vacuoles in the cytoplasm of the cell (Figure 1A). Infection of murine BMM with *C. burnetii* Nine Mile strain, on the other hand, resulted in the formation of large spacious vacuoles, which were easily observed with light and/or EM approximately 24h after infection. The *C. burnetii*-containing vacuoles increased in volume over time and soon occupied up to the entire cytoplasm of the cell (Figure 1B). When BMM were infected first with *M. avium* for 4 days, followed by infection with *C. burnetii*, the mycobacterial vacuoles fused with the large vacuoles containing *C. burnetii*. This was apparent as early as 24h post co-infection. Co-localization of the mycobacteria and *C. burnetii* in the same vacuole was observed by electron microscopy (Figure 1C) and by fluorescence microscopy (not shown). The mean percent fusion of *M. avium* to the *C. burnetii*-containing vacuole as evaluated by light microscopy was $38 \pm 11\%$ at 24h, and increased up to $49 \pm 19\%$ at 48h after the double infection. Examination of the electron micrographs of the infected cells showed that the majority of mycobacteria were within the *C. burnetii*-containing vacuoles. Many mycobacteria remained adjacent to the inner side of the phagosome membrane (Figure 1 and 2). By day 4 post co-

infection, macrophages began to spontaneously detach from the culture plates. Further co-infection experiments were therefore carried out for 3 days.

Characterization of the mycobacteria-*C. burnetii*-containing vacuole:

We next determined whether the phagosomal vacuole containing *C. burnetii* would maintain its acidic characteristics after fusing with the vacuole containing mycobacteria. We used the DAMP stain technique to facilitate visualization of an acidic environment. DAMP is a weak base which accumulates exclusively in the acidic compartments of cells. After fixation and processing for EM, the presence of DAMP can be revealed by immunostaining of the sections with gold-conjugated antibodies. The density of gold particles in a given cell compartment is inversely proportional to its pH. Virtually no gold particles were seen in mycobacterium-containing vacuoles, using this method (Figure 2). On the other hand, gold particles were easily detected in large numbers inside the vacuoles containing both *C. burnetii* and *M. avium* as well as in those vacuoles containing *C. burnetii* alone (Figure 2). Gold particles were also seen in the process of being transferred into the large coxiella-containing vacuoles but not into the mycobacteria-containing vacuoles suggesting that lysosomes fused with the former but not the latter vacuoles (Figure 3). These results indicate that mycobacteria were co-localized with *C. burnetii* in vacuoles with low pH.

Growth of *M. avium* after fusion with the acidified vacuole: When BMM were infected with *M. avium* only, the mycobacteria grew exponentially inside the murine phagocytes, multiplying about 6-fold in 7 days. Following co-infection of BMM with *M. avium* and *C. burnetii*, and the fusion of the mycobacterial vacuoles with the *C. burnetii*-containing vacuole, no significant change in the growth rate of the *M. avium* was observed (Figure 4). Both the CFU assay (Figure 4 top) and direct counting of auramine stained AFB in the light microscope (Figure 4 bottom), showed that *M. avium* grew as well or even slightly faster in

the doubly infected cells. The doubling time for *M. avium* during seven days of culture was 1.9 days in cells infected with *M. avium* alone, compared to 1.5 days in cells co-infected with *C. burnetii*. These results suggest that fusion of *M. avium* with the acidified phagosome-like vacuoles containing *C. burnetii* does not impair the ability of this organism to multiply.

Growth of *M. tuberculosis* after fusion with the acidified vacuole:

We next determined the effects of co-localization in an acidified *C. burnetii* vacuole on *M. tuberculosis*. Using fluorescent microscopy, the percentage of co-localization of *M. tuberculosis* H37Rv in the *C. burnetii*-containing vacuole was assessed. Similar to the experiments with *M. avium*, there was a progressive co-localization of *M. tuberculosis* in the *C. burnetii*-containing vacuole, which was observed as early as 24h post co-infection. Up to 67 % of the *M. tuberculosis* were co-localized to the *C. burnetii* vacuole by 48h (Figure 5 bottom). When BMM were infected with *M. tuberculosis* only, the mycobacteria multiplied with a doubling time of 2.2 days. Following co-infection of BMM with *C. burnetii*, and fusion of the majority of *M. tuberculosis* vacuoles with the acidified phagosome-like vacuole of *C. burnetii*, the growth of *M. tuberculosis* was inhibited (Figure 5 top). The doubling time for *M. tuberculosis* in cultures co-infected with *C. burnetii* was 7.1 days. Thus, co-localization of *M. tuberculosis* to an acidified phagosome-like vacuole appeared to impair the growth of this organism.

DISCUSSION

Mycobacteria can affect the characteristics of the phagosome in which they reside by preventing phagosome maturation, acidification and phagosome-lysosome fusion. The ability of the mycobacteria to block

fusion has been interpreted as a protective mechanism since it prevents their exposure to potentially toxic low pH and activated lysosomal enzymes. Here, we report that although both *M. avium* strain 25291 and *M. tuberculosis* H37Rv can inhibit the maturation of the macrophage phagosome, they may be differentially susceptible to the antimicrobial effects of the phagosome-like compartment. In contrast to *M. avium* which grows in the *C. burnetii*-containing vacuoles, *M. tuberculosis* growth appears to be inhibited. However, we do not know how long the growth inhibition of *M. tuberculosis* would have been maintained since the experiments could not be continued beyond day 3 post co-infection. Fusion of either *M. avium* or *M. tuberculosis* containing phagosome with an acidified phago-lysosome like compartment did not result in death and/or degradation of the bacteria by the low pH and hydrolytic activity of the vacuole, as indicated by both electron and light microscopy combined with the CFU data.

The robust characteristics of *M. avium* which continue growing well in the acidified phagosome-like compartment are of interest. The strain used in these experiments was originally selected for its ability to grow in mice and may not be representative of the behavior of other laboratory strains and/or clinical isolates of *M. avium*. In contrast to our findings, other studies have shown a correlation between increased phagolysosome fusion and *M. avium* growth inhibition. Slower growth of *M. avium* was observed in macrophages from a resistant mouse strain (bearing the R allele of the *Nramp1* gene), compared to that observed in macrophages from a susceptible strain (*Nramp1* S). The slower growth was correlated with more extensive phagosome-lysosome fusion (16). The growth of clinical isolates of *M. avium* has been shown to be restricted in murine macrophages activated with gamma interferon (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α), but not in macrophages

activated with M-CSF (30). In addition, when mouse macrophages activated by IFN- γ and lipopolysaccharide (LPS) were infected with *M. avium* (42) or *M. bovis* (48) reduced intracellular growth was observed concomitant with an increase in the degrees of phagosome-lysosome fusion and of acidification.

In cell free culture, *M. tuberculosis* has been reported to be more sensitive to an acidic pH than *M. avium* (10). We observed a similar differential susceptibility of these mycobacteria to pH within the host cell vacuole. Furthermore, our results suggest that when mycobacteria enter a compartment already rendered acidic (by *C. burnetii*), the mycobacteria do not appear to change the pH of the vacuole. Whether mycobacteria can continuously modify the vacuoles in which they reside in vivo is not known. It has been observed that when mycobacteria divide, the vacuole appears to divide with them, sequestering each bacillus to a separate tight vacuole (34,35). Also, when clumps of mycobacteria (*M. smegmatis*) are phagocytosed, as the bacilli divide, they appear to segregate to individual tight vacuoles (6). This ability of mycobacteria to remain within a tight vacuole may facilitate their control of fusion of their phagosome with other vacuoles within the cells.

In their interaction with macrophages, *M. avium* and *M. tuberculosis* have been found to differ widely. *M. tuberculosis* has been reported to be more sensitive than *M. avium* to other potential bacteriocidal pathways, including nitric oxide (8,9,19,20,31). On the other hand, *M. avium* is more sensitive to the effects of expression of *Nramp1* than *M. tuberculosis* (33,2). Despite these differences in sensitivity to macrophage protective mechanisms, many investigators assume that these mycobacteria are analogous because they appear to inhabit the same intracellular compartment. Taken together, the present

studies and those of others suggest that observations made on one mycobacterium may not necessarily apply to other mycobacteria.

A limitation of our model is the apparent incomplete fusion of mycobacterial vacuoles with the *C. burnetii*-containing phagosome-like vacuoles. Using light microscopy we have shown 49% of intracellular *M. avium* and 67% of *M. tuberculosis* to co-localize to the *C. burnetii* containing vacuole by 48h. However, our electron microscopy studies suggest that the light microscopy count may be an under estimation of co-localization since many mycobacteria remain adjacent to the vacuole membrane (Figure 2A) and it is difficult to determine by light microscopy exactly where they are located. Examination of the electron micrographs from the present study showed that there was indeed a higher degree (80-90%) of co-localization of the two organisms. In addition, de Chastellier and Rabinovitch examined hundreds of co-infected cells using quantitative electron microscopy and observed a progressive co-localization of *M. avium* and *C. burnetii* which reached up to 90% by 48h (de Chastellier et al, manuscript in preparation). Many of the vacuoles seen in those preparations were too small to be detected by light microscopy. We therefore assume that the percentage of co-localization reported here is an under estimation of the actual co-localization of mycobacteria and *C. burnetii* in the co-infected cells.

The ability of mycobacteria to block phagosome-lysosome fusion may not only save the organisms from a hostile low pH environment, but also confer a survival advantage to mycobacteria by facilitating the access to nutrients. Russell et al. have shown that mycobacterial phagosomes interact with plasmalemma-derived vesicles and acquire molecules from outside the cell (41,44). Also, Clemens and Horwitz have shown that *M. tuberculosis* phagosomes contain transferrin receptors from the cell surface which allow transfer of iron into the

vacuole (11,12). The traffic of transferrin bound iron occurs at the early endosome stage, the stage at which mycobacteria arrest the maturation of the phagosome. Iron is an essential nutrient for mycobacteria, so access to this element may facilitate growth (18,21,26). The sensitivity of *M. tuberculosis* to low pH may contribute to the control of this infection in humans. This control is dependent on macrophage activation by an emerging immune response. Therefore, if the infecting mycobacteria are recognized and there is an early immune response that triggers the activation of phagocytes, facilitating phagosome-lysosome fusion, the infection may be controlled. However if immune activation is delayed and the number of organisms increases before acidification of the vacuole occurs, extensive growth of the mycobacteria may take place and clinical disease will eventually become manifest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by NIH grant AI 22616. Maria Salomé Gomes was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal.

We would like to thank Dr. Victoria H. Freedman for help in preparation of the manuscript, Wilhelmine Hellmann for expert assistance in all aspects of electron microscopy, Marguerite Nulty for secretarial help and Judy Adams for preparation of the figures.

FIGURE LEGENDS

Figure 1- Electron micrograph of murine BMM infected with (A) *M. avium* [M]. Note the tight vacuole containing the bacterium [double arrows] (magnification x 19,800); (B) Murine BMM infected with *C. burnetii* [C]. Note the large vacuole [V] occupying almost the entire

cytoplasm of the cell and eccentric nucleus [N] (magnification x 3,300); (C) 24h post co-infection of murine BMM with *M. avium* and *C. burnetii*. Note co-localization of the two organisms in the same large vacuole [arrows point to the organisms] (magnification x 8,300).

Figure 2- Electron micrograph of murine BMM infected with *M. avium* [M] and/or *C. burnetii* [C] and stained with DAMP and gold conjugated antibody. (A and B) Co-infected cells with vacuoles containing *M. avium* and *C. burnetii*; (C and D) cells with vacuole containing *C. burnetii* only; (E and F) cells infected with *M. avium* only. Note presence of gold particles indicating the low pH environment within the vacuole [V] occupied by the two organisms and by *C. burnetii* only. Only a few gold particles are seen within the vacuoles containing *M. avium* only, or in the nucleus [N] or in mitochondria [m] of the cells. (Magnification: A x 30,000; B x 30,000; C x 16,000; D x 86,000; E x 46,000, F x 32,000.) D is a high magnification of C.

Figure 3-Electron micrograph of murine BMM stained with DAMP and gold conjugated antibody. (A) Uninfected cell (24 h in culture) with small vacuoles (lysosomes) containing gold particles; (B) Uninfected cell (5 days in culture) with larger vacuoles (secondary lysosomes) containing gold particles; (C) Cell co-infected with *C. burnetii* (not seen in the figures) and *M. avium* [M]. Vacuoles containing gold particles are seen fusing with the large vacuole [V] of *C. burnetii* but are not seen fusing with the vacuole containing *M. avium*. Gold particles are not seen in the nucleus [N] or mitochondria [m] of the cells. (Magnification: A x 43,000; B x 40,000; C x 48,000.)

Figure 4-Growth of *M. avium* in murine BMM (open symbols) and in cells co-infected with *C. burnetii* (closed symbols). BMM were infected with *M. avium* and then co-infected with *C. burnetii* on day 4 (designated in the graph as time 0). Growth of *M. avium* was evaluated by CFU (top panel) and by direct counting of AFB by light microscopy (bottom panel). Results are means \pm one standard deviation expressed as percent of baseline values for three independent experiments. At baseline (time 0) CFU were 55 ± 11 and $56 \pm 6 \times 10^4$ and AFB were 8.2 and 7.4 per cell for *M. avium* alone and *M. avium* with *C. burnetii* respectively. Using an independent t test to compare the two groups $p > 0.05$ at all time points.

Figure 5- Growth of *M. tuberculosis* in murine BMM (open symbols) and in cells co-infected with *C. burnetii* (closed symbols). BMM were infected with *M. tuberculosis* and then co-infected with *C. burnetii* on day 4 (designated in the graph as time 0). Growth of *M. tuberculosis* was evaluated by CFU (top panel). The percent of *M. tuberculosis* co-localized within the *C. burnetii*-containing vacuole is shown in the bottom panel. Results are means \pm one standard deviation expressed as percent of baseline values for three independent experiments. At baseline (time 0) CFU were 3.3 ± 0.8 and $4.6 \pm 1.6 \times 10^4$ for *M. tuberculosis* alone and for *M. tuberculosis* with *C. burnetii* respectively. Using an independent t test to compare the two groups $p = 0.02$ at day 3.

REFERENCES

1. Anderson, R.G.W., J.R. Falck, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1984. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4838-4842.

2. **Appelberg, R., and A.M. Sarmiento.** 1990. The role of macrophage activation and Bcg-encoded function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 88 :324-331.
3. **Appelberg, R., and I.M. Orme.** 1993. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Infect. Immun.* 80: 352-359.
4. **Armstrong, J.A., and P. D'Arcy Hart.** 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134:713-740.
5. **Armstrong, J.A., and P. D'Arcy Hart.** 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.* 142: 1-16.
6. **Barker, K., H. Fan, C. Carrol, G. Kaplan, J. Barker, W. Hellmann, and Z.A. Cohn.** 1996. Nonadherent cultures of human monocytes kill *Mycobacterium smegmatis*, but adherent cultures do not. *Infect. Immun.* 64:428-433.
7. **Berón, W., C. Alvarez-Dominguez, L. Mayorga, and P.D. Stahl.** 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell. Biol.* 5 : 100-104.
8. **Chan, J., Y. Xing, R.S. Magiozzo, 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.
9. **Chan, J., K. Tanaka, D. Carroll, J. Flynn, and B.R. Bloom.** 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63: 736-740.

10. **Chapman, J.S., and J.S. Bernard.** 1962. The pH tolerance of unclassified mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 86:582-583.
11. **Clemens, D.L., and M.A. Horwitz.** 1996. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J. Exp. Med.* 184:1349-1355.
12. **Clemens, D.L., and M.A. Horwitz.** 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181:257-270.
13. **Crowle, A.J., R. Dahl, E. Ross, and M.H. May.** 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect. Immun.* 59:1823-1831.
14. **Denis, M.** 1991. Growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. *Eur. J. Immunol.* 21: 391-395.
15. **Desjardins, M.** 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. *Trends in Cell Biology* 5:183-186.
16. **de Chastellier, C., C. Frehel, C. Offredo, and E. Skamene.** 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.
17. **de Chastellier, C., M. Thibon, and M. Rabinovitch.** 1995. Efficient fusion of *Mycobacterium avium* vacuoles with those that shelter the rickettsia *Coxiella burnetii* in doubly infected mouse macrophages. 35th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington, DC.

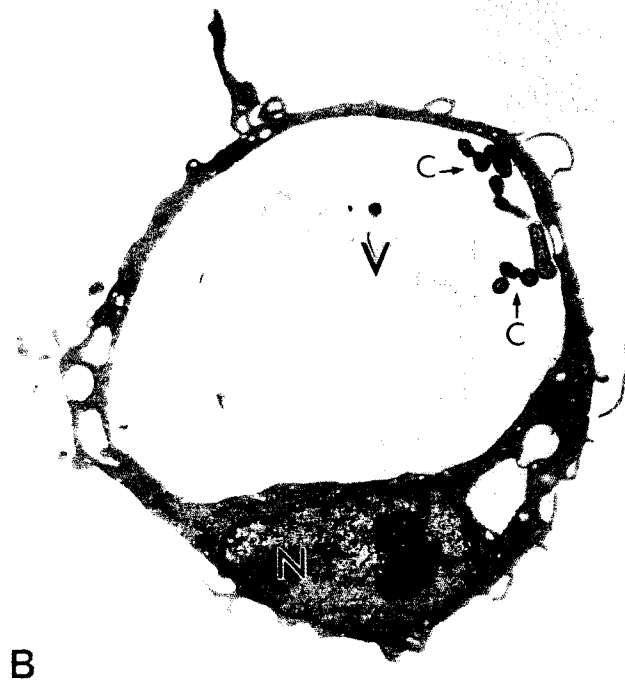
18. **Dhople, A.I., and T.C. Poirier.** 1996. Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios.* 87: 77-87.
19. **Doherty, T.M., and A. Sher** 1997. Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* 158: 4822-4831.
20. **Doi, T., T Akaike, M. Suga, K. Sato, and H. Maeda.** 1993. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immunity.* 61: 1980-1989.
21. **Douvas, G.S., M.H. May, and A.J.Crowle.** 1993. Transferrin, iron and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J. Infect. Dis.* 167: 857-864.
22. **Fenton, M.J., and M.W. Vermeulen.** 1996. Immunopathology of tuberculosis: Role of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.* 64:683-690.
23. **Flesh, 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.
24. **Flesh, I.E., and S.H.E. Kaufmann.** 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 58: 2675-2677.
25. **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.
26. **Gomes, M.S., and R. Appelberg** 1998. Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology.* 95: 165-168.

27. **Hackstadt, T., and J.C. Williams** 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukariotic cells by *Coxiella burnetii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3240-3244.
28. **Hackstadt, T.** 1996. Biosafety concerns and *Coxiella burnetii*. Trends Microbiol. 4:341-342.
29. **Heizen, R.A., M.A. Scidmore, D.D. Rockey, and T. Hackstadt.** 1996. Differential interaction with endocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. Infect. Immun. 64:796-809.
30. **Hsu, N., L.S. Young, and L. E. Bernmudez.** 1995. Response to stimulation with recombinant cytokines and synthesis of cytokines by murine intestinal macrophages infected with the *Mycobacterium avium* complex. Infect. Immun. 63: 528-533.
31. **MacMicking, J.D., R. LaCourse, J.S. Mudgett, S.K. Shah, and C.F. Nathan.** 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5243-5248.
32. **Maurin, M., A.M. Benoliel, P. Bongrand, and D. Raoult.** 1992. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. Infect. Immun. 60:5013-5016.
33. **Medina, E., B.J. Rogerson, and R.J. North.** 1996. The Nramp1 antimicrobial resistance gene segregates independently of resistance to virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Immunol. 88: 479-481
34. **Molloy, A., P. Laochumroonvorapong, and G. Kaplan.** 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular *Bacillus Calmette-Guerin*. J. Exp. Med. 180:1499-1509.

- 35. Moreira, A.L., J. Wang, L. Tsenova-Berkova, W. Hellmann, V.H. Freedman, and G. Kaplan.** 1997. Sequestration of *Mycobacterium tuberculosis* in tight vacuoles in vivo in lung macrophages of mice infected by the respiratory route. *Infect. Immun.* 65: 305-308.
- 36. Nathan, C., and J. Hibbs Jr.** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65-70.
- 37. Oh, Y.-K., and R.M. Straubinger.** 1996. Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infect. Immun.* 64: 319-325.
- 38. Paul, S., P. Laochumroonvorapong, and G. Kaplan.** 1996. Comparable growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages in vitro. *J. Infect. Dis.* 174:105-112.
- 39. Raoult, D., M. Drancourt, and G. Vestris.** 1990. Bactericidal effect of doxycycline associated with lysosomotropic agents on *Coxiella burnetii* in P388D1 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1512-1514.
- 40. Robinson, M.S., C. Watts, and M. Zerial.** 1996. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84: 13-21.
- 41. Russell, D.G., J. Dant, and S. Sturgill-Koszycki.** 1996. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*- containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J. Immunol.* 156: 4764-4773.

42. Schaible, U.E., S. Sturgill-Koszycki, P.H. Schlesinger, and D.G. Russell. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* 160:1290-1296.
43. Sturgill-Koszycki, S., P.H. Schlesinger, P. Chakraborty, P.L. Haddix, H.L. Collins, A.K. Fok, R.D. Allen, S.L. Gluck, J. Heuser, and D.G. Russell. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681.
44. Sturgill-Koszycki, S., U.E. Schaible, and D.G. Russell. 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15: 6960-6968
45. Veras, P.S., C. de Chastellier, M.F. Moreau, V. Villiers, M. Thibon, D. Mattei, and M. Rabinovitch. 1994. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in chinese hamster ovary cells. *J Cell Science* 107:3065-3076.
46. Veras, P.S., C. Moulia, C. Dauguet, C.T. Tunis, M. Thibon, and M. Rabinovitch. 1995. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 63: 3502-3506.
47. Via, L.E., D. Deretic, R.J. Ulmer, N.S. Hibler, L.A. Huber, and V. Deretic. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272:13326-13331

48. **Via, L.E., R.A. Fratti, M. McFalone, E. Pagán-Ramos, D. Deretic, and V. Deretic.** 1998. Effects of cytokines in mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell Science.* 111: 897-905
49. **Xu, S., A. Cooper, S. Sturgill-Koszycki, T. van Heyningen, D. Chatterjee, I.M. Orme, P. Allen, and D.G. Russell.** 1994. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J. Immunol.* 153:2568-2578.



B



C

FIG:1

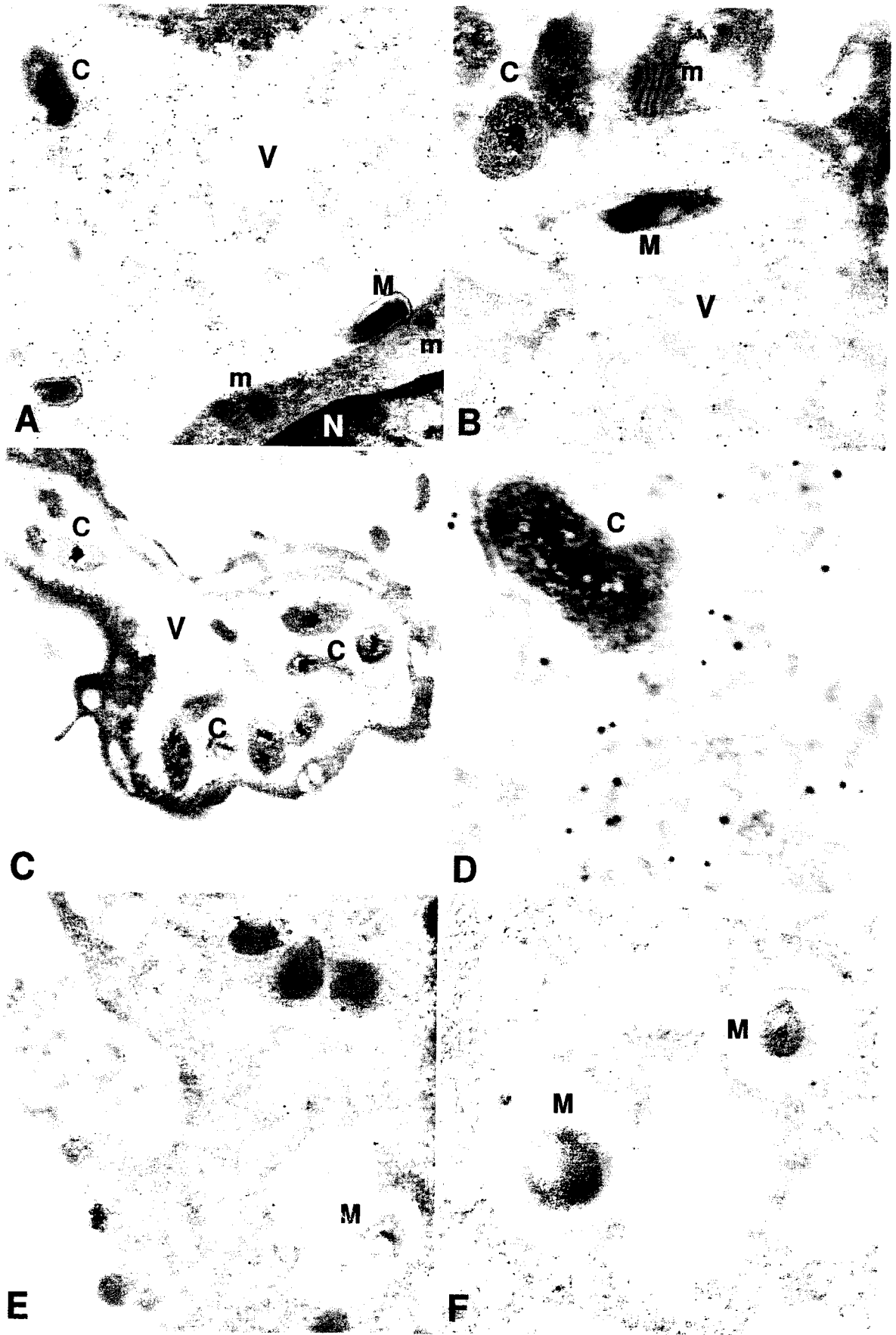


FIG. 2

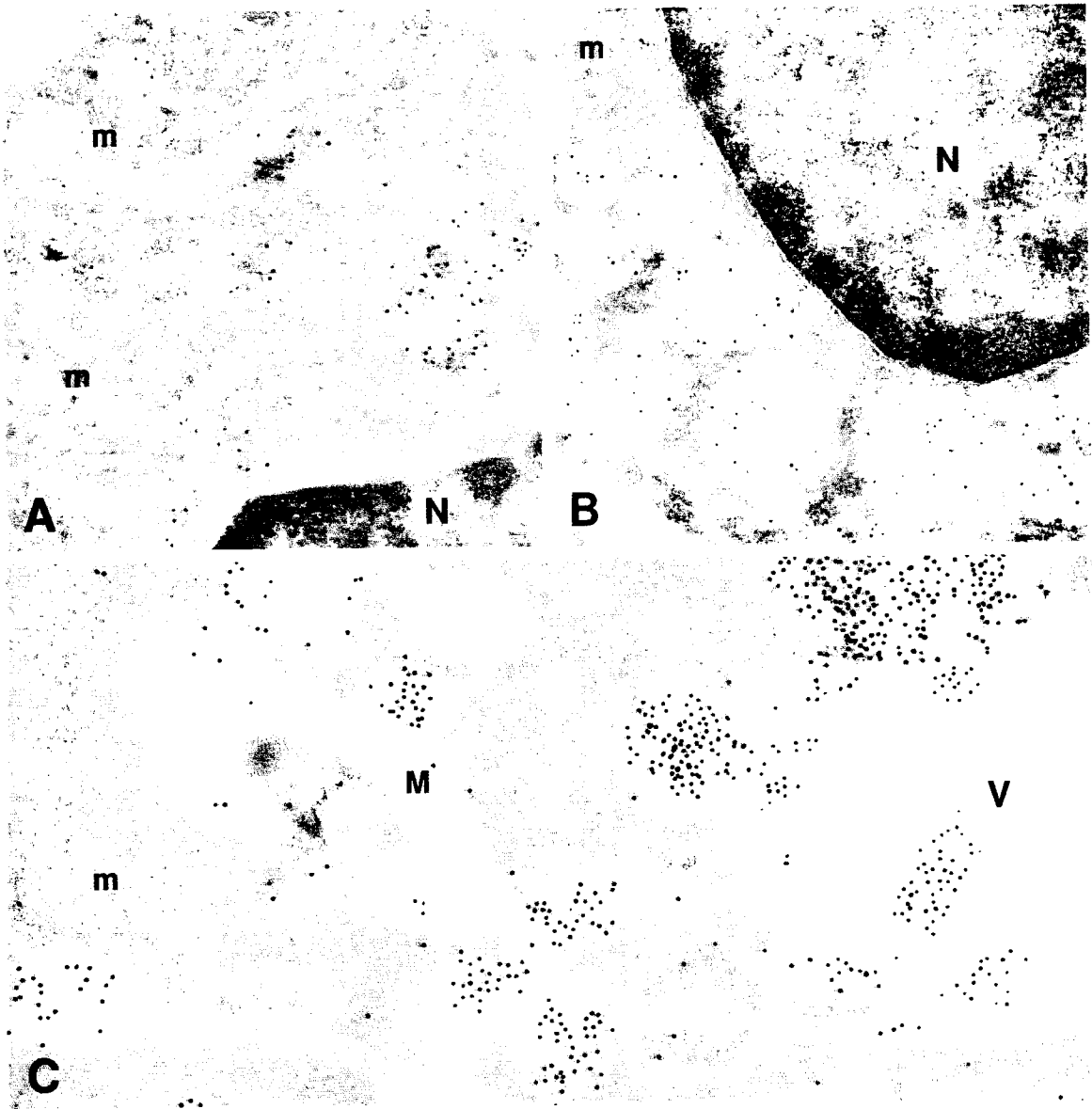


fig. 3

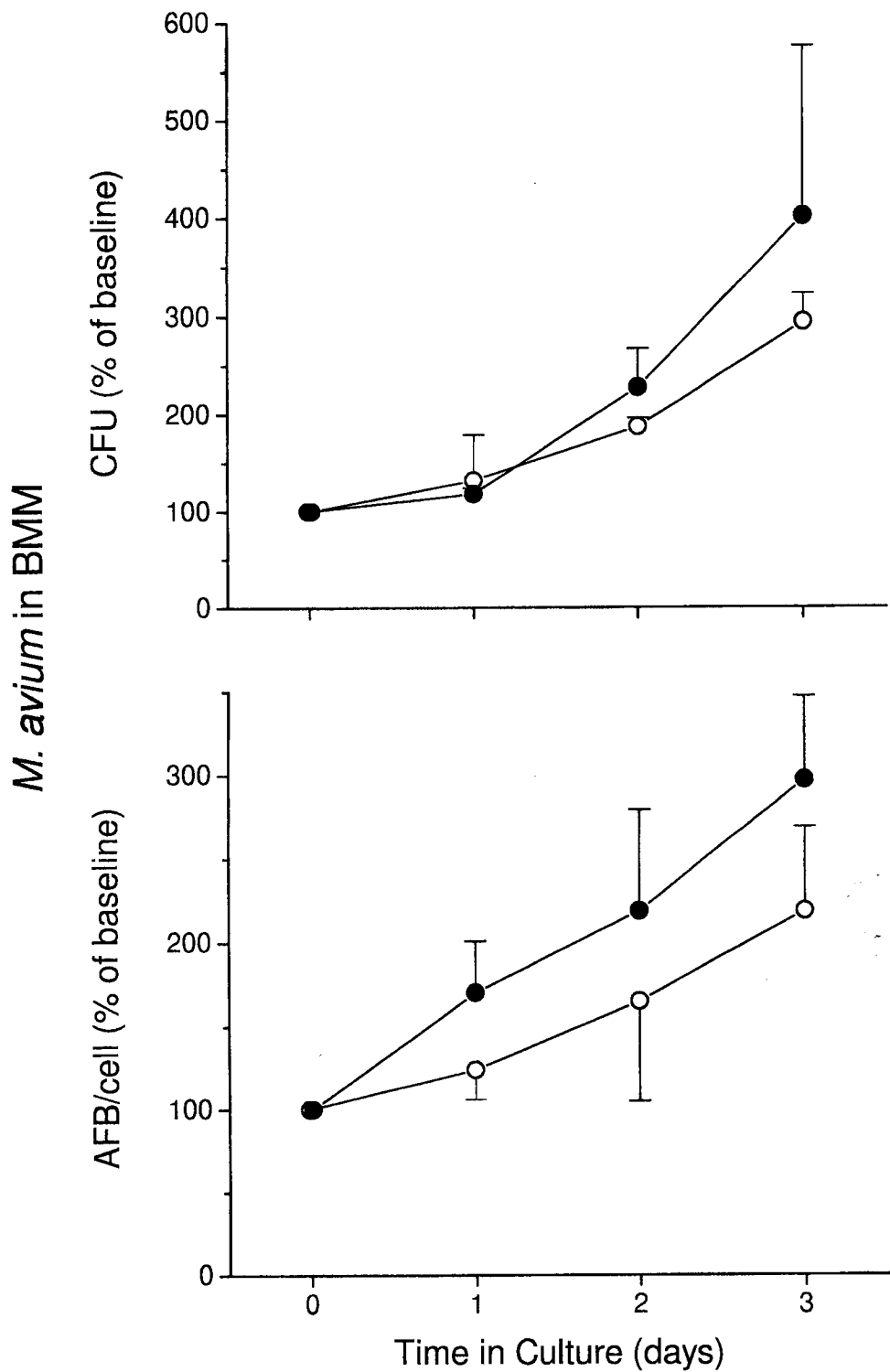


FIG. 4

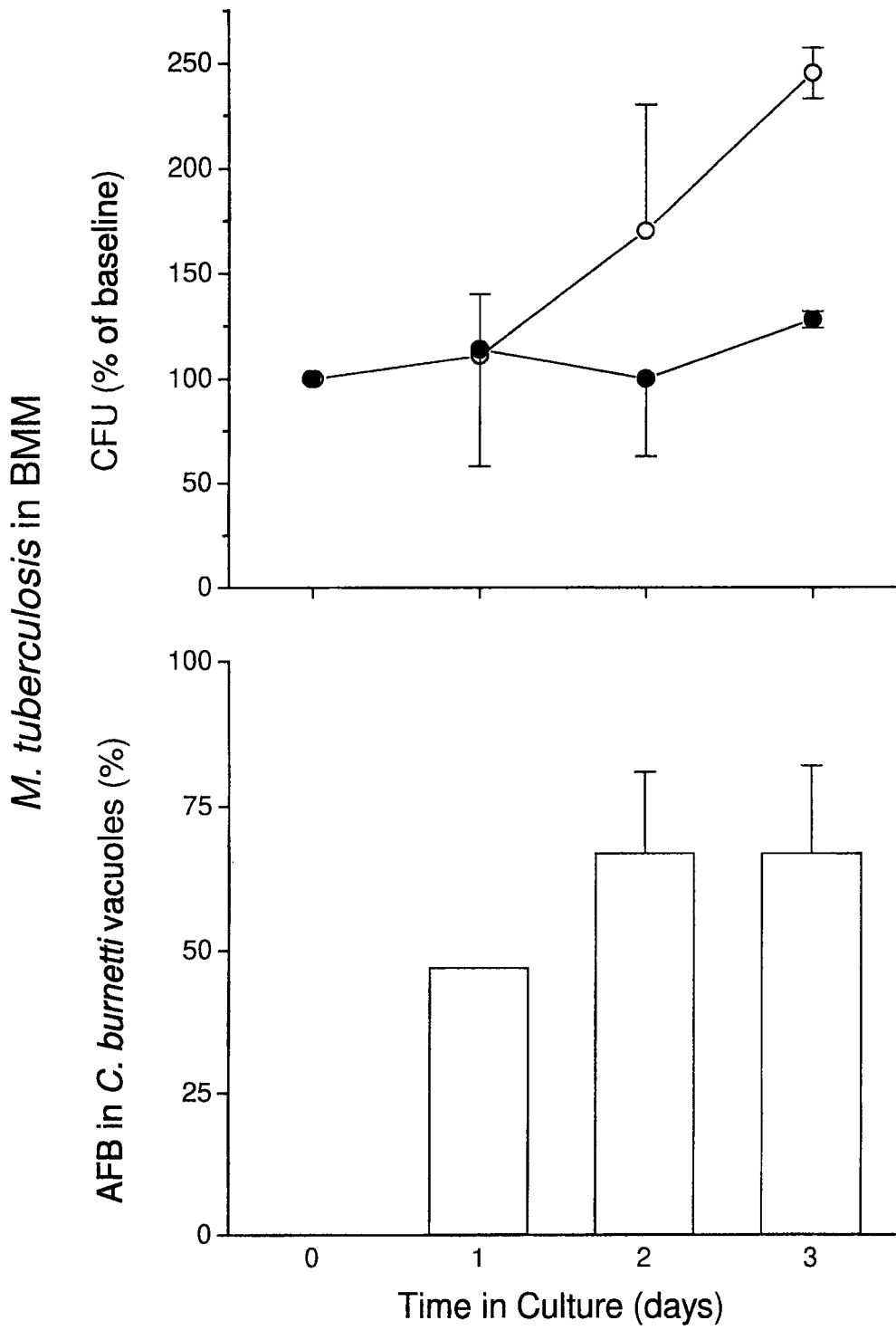


FIG. 5

Capítulo V-2

"O efeito micobacteriostático do IFN γ não depende de um aumento de acidificação do fagossoma que contém o *Mycobacterium avium*"

Salomé Gomes e Rui Appelberg, com a colaboração do prof. Manuel Teixeira da Silva e o apoio técnico de Irene Barros e Paula Macedo

Dados não publicados

Tal como foi referido no capítulo anterior, o *Mycobacterium avium* de estirpes virulentas cresce exponencialmente no interior de macrófagos derivados da medula óssea de ratinho. Trabalhos de Appelberg e Orme, em 1993, mostraram que o tratamento desses macrófagos com IFN γ e/ou TNF α , levava à restrição do crescimento intracelular da micobactéria. Os mecanismos pelos quais as citocinas exercem esse efeito micobacteriostático não são no entanto conhecidos. Appelberg e Orme verificaram no mesmo trabalho que a adição de inibidores da produção quer de monóxido de azoto, quer de determinadas espécies reactivas de oxigénio, não diminuiu o efeito micobacteriostático do IFN γ . Por outro lado, a adição de cloreto de amónio, que provoca a alcalinização do vacúolo, anulou o efeito desta citocina, favorecendo a proliferação da micobactéria. Estes resultados são consistentes com as observações de Crowle et al em 1991, segundo as quais o vacúolo que contém *M. avium* viáveis no interior de células macrofágicas tem pH próximo da neutralidade, enquanto que bactérias mortas se encontram em compartimentos acídicos. Poderia pois pensar-se que o efeito micobacteriostático do IFN γ resulta directamente da indução da acidificação do vacúolo fagocítico.

Para testar esta hipótese, decidimos proceder à avaliação do grau de acidificação do vacúolo contendo o *M. avium*, em macrófagos derivados da medula óssea de ratinho (BMM \emptyset), estimulados ou não com IFN γ e TNF α .

BMM \emptyset derivados de ratinhos BALB/c foram infectados com *M. avium* 25291SmT (segundo protocolo descrito no capítulo anterior) e estimulados com IFN γ , 1000 Unidades por ml, ou IFN γ 1000U/ml + TNF α 500 U/ml (Genzyme, Cambridge, MA), cada dois dias. Ao fim de 4 e 7 dias de infecção, procedeu-se à medição do pH no interior do

fagossoma que alberga o *M. avium* nestes macrófagos, comparando-o com o pH encontrado em macrófagos que não receberam citoquinas.

A técnica usada para a avaliação da acidificação dos fagossomas foi já descrita no capítulo anterior e, originalmente, por Anderson et al, em 1984. Resumidamente, a técnica permite relacionar o grau de acidificação de um compartimento intracelular com a densidade de partículas de ouro observadas nesse compartimento por microscopia electrónica após imunocitoquímica ultraestrutural. As células a analisar são incubadas com DAMP (3-(2,4-dinitroanilo)-3'-amino-N-metildipropilamina), base fraca que se acumula nos locais ácidos. Depois de lavado o excesso de DAMP, as células são fixadas e processadas para microscopia electrónica. Nos cortes montados em grelhas de níquel, é aplicado um anticorpo que reconhece o DAMP e de seguida um anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal. A densidade de partículas de ouro presentes num dado compartimento intracelular, evidenciadas ao microscópio electrónico, será directamente proporcional à acidez desse compartimento.

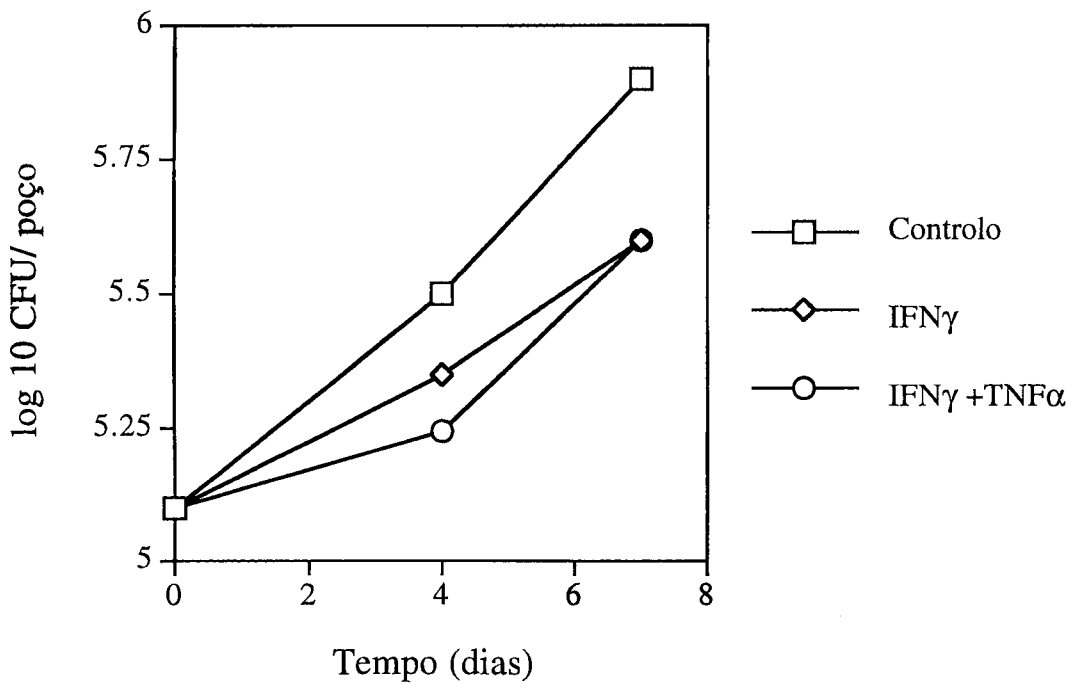
Os resultados das experiências efectuadas estão resumidos na tabela seguinte.

	número de partículas por fagossoma	
	experiência 1	experiência 2
Controlo, 4 dias	3.1	4.4
IFN γ , 4 dias	2.6	5.1
IFN γ + TNF α , 4 dias	não foi feito	8.2
Controlo, 7 dias	8.8	3.5
IFN γ , 7 dias	4.8	4.2
IFN γ + TNF α , 7 dias	não foi feito	4.9

A densidade de partículas de ouro, logo o grau de acidificação dos fagossomas, não é significativamente diferente entre os macrófagos não tratados ou tratados com as citoquinas referidas. As pequenas diferenças encontradas não são estatisticamente significativas quando se aplica o

teste t de Student. Na primeira das experiências descritas, foram encontrados bacilos morfologicamente alterados (presumivelmente por se encontrarem inviáveis no inóculo original). Nos fagossomas contendo estes bacilos, a densidade de partículas de ouro encontrada foi de 30 a 40 partículas por fagossoma, o que denota uma acidificação muito mais acentuada, quando comparada com os valores de 4 a 8 partículas por fagossoma, encontradas em fagossomas que contêm *M. avium* viáveis. Na segunda experiência, o inóculo utilizado, em lugar de resultar de alíquotas previamente congeladas, proveio de cultura em meio líquido em fase exponencial de crescimento, pelo que não foram encontrados bacilos danificados no interior dos macrófagos.

Para verificar se os tratamentos com citocinas alteraram de facto o crescimento intramacrofágico do *M. avium*, foi avaliado esse crescimento, usando o protocolo descrito no capítulo anterior e também nos capítulos VI e VII. Os resultados obtidos estão representados no gráfico seguinte.



Do trabalho descrito acima conclui-se que é possível induzir a inibição do crescimento do *M. avium* no interior de BMMØ pelo tratamento desses macrófagos com IFN γ sozinho ou em combinação com o TNF α e para que haja esta inibição de crescimento, não é necessário um aumento do grau de acidificação do fagossoma que contém a micobactéria.

Estes resultados são consistentes com os obtidos nas experiências descritas no capítulo V-1, em que verificámos que a transferência do *M. avium* para um compartimento ácido não alterou o seu ritmo de crescimento intramacrofágico.

Recentemente foi descrito na literatura que o tratamento de BMMØ com IFN γ e LPS levava a uma acidificação dos fagossomas contendo o *M. avium* (Schaible et al, 1998). O tipo de tratamento aplicado aos macrófagos descrito nesse trabalho é no entanto substancialmente diferente daquele que nós efectuámos, já que inclui LPS bacteriano. O protocolo descrito induz, segundo os autores, a morte intracelular das micobactérias, no que difere claramente do nosso protocolo, que induz apenas bacteriostase. Daqui resulta também que a diminuição do pH dos fagossomas poderá ser devido à maturação mais extensa de fagossomas contendo bacilos inviáveis.

Continua por esclarecer quais são os mecanismos desencadeados pelo IFN γ nos macrófagos que causam a diminuição do crescimento intracelular do *M. avium*, assim como a razão pela qual o efeito da citoquina é revertido pelo cloreto de amónio.

Capítulo VI

"Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the
iNOS gene".

M. S. Gomes, M. Flórido, T.F. Pais e Rui Appelberg

The Journal of Immunology 1999, 162: 6734-6739

Improved Clearance of *Mycobacterium avium* Upon Disruption of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene¹

M. Salomé Gomes, Manuela Flórido, Teresa F. Pais, and Rui Appelberg²

Mice genetically deficient in the inducible NO synthase gene (iNOS^{-/-}) were used to study the role played by NO during infection by *Mycobacterium avium*. iNOS^{-/-} macrophages were equally able to restrict *M. avium* growth in vitro following stimulation by IFN- γ and TNF- α as macrophages from wild-type mice. In vivo, the infection progressed at similar rates in wild-type and NO-deficient mice during the first 2 mo of infection, but the latter mice were subsequently more efficient in clearing the mycobacteria than the former. The increased resistance of iNOS^{-/-} mice was associated with higher IFN- γ levels in the serum and following in vitro restimulation of spleen cells with specific Ag, increased formation of granulomas and increased survival of CD4⁺ T cells. We show that NO is not involved in the antimycobacterial mechanisms of *M. avium*-infected macrophages and, furthermore, that it exacerbates the infection by causing the suppression of the immune response to the pathogen. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 6734–6739.

Mycobacterium *avium* is an opportunistic pathogen of immunocompromised human patients, such as those in advanced stages of AIDS, and occasionally infects immunocompetent individuals such as chronic obstructive pulmonary disease sufferers and children, the latter developing lymphadenitis (1). This pathogen is a facultative intracellular parasite that resides inside the macrophages of the infected host in membrane-bound vacuoles interacting poorly with the lysosomal compartment (2). In vitro studies in our laboratory and others have shown that although *M. avium* can grow exponentially inside nonactivated macrophages, this growth is restricted if macrophages are stimulated with cytokines, namely IFN- γ and TNF- α (3, 4). The antimicrobial mechanisms used by the activated macrophages to control *M. avium* growth are not clear. The oxygen-reactive intermediates produced by activated macrophages do not seem to play a major role in the control of bacterial proliferation, with the exception of a few strains with limited virulence (5). Recently, it has been argued that the acidification of *M. avium*-containing phagosomes following stimulation of these phagocytes with IFN- γ and LPS was underlying the killing of the infecting mycobacterium (6).

Following the observations by Stuehr and Marletta (7, 8) that macrophages can secrete large amounts of nitrite and nitrate in response to bacterial products and cytokines, there have been countless reports implicating NO in the antimicrobial activity of macrophages against a wide variety of microorganisms (reviewed in Refs. 9 and 10). In the case of mycobacteria, NO is claimed to play a crucial role in the control of *M. tuberculosis* and *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). Chan et al. (11) have shown that

the restriction of *M. tuberculosis* growth induced in macrophages by IFN- γ plus LPS or TNF- α was partially reverted by the addition of an inducible NO synthase (iNOS)³ inhibitor. The same authors used two NO synthase inhibitors in vivo to treat mice after infection with *M. tuberculosis*. Mice rendered incapable of producing NO during infection showed increased mortality along with increased numbers of mycobacteria in their organs, as compared with control untreated mice (12). These results were more recently confirmed by MacMicking et al. (13) using iNOS gene-disrupted mice. Studying the mechanisms of microbial growth inhibition in IFN- γ -activated macrophages, Fleisch and Kaufmann (14) have also found a role for NO in the inhibition of growth of *M. bovis* BCG.

In the case of *M. avium*, the role of NO is not so clearly established. When studying the interaction of *M. avium* with bone marrow-derived macrophages (BMM ϕ) in vitro, we saw that most strains are not eliminated inside the macrophages, but rather persist and grow. The growth of a wide panel of *M. avium* strains was shown to be inhibited if the macrophages were treated with IFN- γ and/or TNF- α (3, 4). However, this restriction of mycobacterial growth was not reversed in the presence of the NO synthase inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine (3). Similar observations were also reported by Bermudez (15). Observations by other groups on the resistance of *M. avium* to nitrite or NO generated in vitro (16, 17) further suggested that the production of nitrogen-reactive species was not a key factor in the control of *M. avium* infection in the mouse. More recently, Doherty and Sher (18), using iNOS gene-disrupted mice, showed that *M. avium* growth was not increased in the absence of iNOS and suggested a negative role for NO in the suppression of T cell function.

We used iNOS-deficient mice to assess the role of NO in *M. avium* infection and found that NO strongly exacerbated *M. avium* infection at late time points, probably by inhibiting the production of IFN- γ by Ag-specific T cells. While this manuscript was being prepared, Karupiah et al. (19) reported that iNOS gene-disrupted mice showed increased resistance to infection by influenza A virus. These authors showed that this increased resistance was associated

Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Porto, Portugal

Received for publication January 4, 1999. Accepted for publication March 17, 1999.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by contract P/SAU38/96 from the PRAXIS XXI programme (Lisbon). M.S.G., M.F., and T.F.P. received fellowships from the PRAXIS XXI programme.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Rui Appelberg, Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, Rua do Campo Alegre 823, 4150-171 Porto, Portugal. E-mail address: rappelb@ibmc.up.pt

³ Abbreviations used in this paper: iNOS, inducible NO synthase; BMM ϕ , bone marrow-derived macrophage; LCCM, L-929 cell conditioned medium; Nramp1, natural resistance-associated macrophage protein 1; SmT, smooth transparent; SmD, smooth-domed.



FIGURE 1. Genotype of the *iNOS*^{-/-} mice in relation to the *Nramp1* allele. Shown are the PCR products after specific amplification for the two alleles of the *Nramp1* gene performed as described in *Materials and Methods* in genomic DNA from 129Sv, (129Sv × C57BL/6)_{F₁}, C57BL/6, and the *iNOS*^{-/-} mice.

with and dependent on an increased production of IFN- γ by lung cells and that *iNOS* gene-disrupted mice had less inflammation-related lung pathology.

Materials and Methods

Bacteria

M. avium strain 25291, smooth transparent (SmT) variant, was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Strains 2447 SmT and 2-151 SmD were isolated from AIDS patients and given to us by F. Portaels (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium) and J. Belisle (Colorado State University, Fort Collins, CO), respectively.

All mycobacteria were grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI) with 0.04% Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO). Cultures were harvested during log phase, centrifuged, washed in saline with Tween 80, briefly sonicated, and stored in aliquots at -70°C until used.

Animals

iNOS-deficient mice were bred in our facilities from a breeding pair kindly provided by Drs. J. D. MacMicking and C. Nathan (Cornell University, New York, NY) and J. Mudgett (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ) (20). These mice were kept in HEPA-filter-bearing cages and fed sterilized chow and water. From the initial breeders, males were chosen to start the backcrossing with C57BL/6 females. Backcrossing was monitored by performing PCR of the markers for the disrupted gene on DNA samples from the progeny as described below. In one experiment, the progeny of the seventh backcross were used in an *in vivo* infection experiment.

C57BL/6 mice were purchased from the Gulbenkian Institute (Oeiras, Portugal), and 129Sv mice were purchased from Harlan (Bicester, U.K.). These mice were kept under standard hygiene conditions.

PCR screening for natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) allele

Genomic DNA samples were obtained from each mouse by treating a portion of the ear with proteinase K (Sigma). The amplification of the *Nramp1* gene was performed using *Taq* DNA polymerase (Ampligène-Oncor, Gaithersburg, MD) and primers specific for the *Nramp1* gene, one oligonucleotide being common to both alleles and the other being specific for either R or S allele, as described elsewhere (21). The amplification was done in a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer-Roche, Branchburg, NJ). Results for the *iNOS*^{-/-} mice, as well as 129Sv, C57BL/6, and (129Sv × C57BL/6)_{F₁} mice, are shown in Fig. 1. According to the results of this screening, 129Sv mice were used in all experiments as *iNOS*^{+/+} controls, except for the one experiment where the mice had been backcrossed to C57BL/6.

Infection of BMM ϕ

Macrophages were derived from the bone marrow as follows. Each femur was flushed with 5 ml of HBSS. The resulting cell suspension was centrifuged and the cells resuspended in DMEM (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing 10% FBS (Life Technologies) and 10% L929 cell-conditioned medium (LCCM) as a source of M-CSF. The cells were distributed in 24-well plates and incubated at 37°C in a 7% CO_2 atmosphere. Three days after seeding, another 0.1 ml of LCCM was added. On the 7th day, the medium was renewed.

On the 10th day of culture, when cells were completely differentiated into macrophages, they were infected with *M. avium*. To each well, about 10^6 CFU of *M. avium* were added, in 0.2 ml of DMEM. Cells were incubated for 4 h at 37°C in a CO_2 atmosphere and then washed with warm HBSS to remove noninternalized bacteria and reincubated in DMEM, with 10% FBS and 10% LCCM. In some of the wells, the macrophages were immediately lysed and the number of viable intracellular bacteria counted

as described below (time zero). The other cells were incubated during 7 days to measure the intracellular growth of the bacteria.

The measurement of mycobacterial growth was done by counting CFU. Briefly, 7 days after infection, the cells were lysed by adding 0.1% saponin to each well. The resulting bacterial suspension was serially diluted 1:10 in water containing 0.04% Tween 80. The dilutions were plated on Middlebrook 7H10 agar (Difco) and the number of colonies counted 8–10 days later. For each condition tested, three culture wells were used. The results presented correspond to the mean and SD of these three wells.

In some of the experiments, macrophages were treated from day 0 to day 4 of infection with recombinant murine IFN- γ (100 U/well/day), alone, or in combination with recombinant murine TNF- α (50 U/well/day) (both cytokines from Genzyme, Cambridge, MA).

In vivo infection

Each mouse was infected *i.v.* with 10^6 CFU of *M. avium*, either strain 2447 SmT or strain 25291 SmT (two independent experiments). At different time points, animals were sacrificed and their livers, spleens, and lungs collected. These organs were homogenized, and serial dilutions of the resulting suspensions were plated in Middlebrook 7H10 agar medium, as described above for BMM ϕ cultures, and the bacterial colonies counted after culture for 10 days at 37°C .

In one of the experiments, endogenous IFN- γ activity was blocked by treating mice with anti-IFN- γ IgG1, obtained from the hybridoma XMG1.2 (DNAX, Palo Alto, CA). Control mice were treated with normal rat Ig. Abs were given *i.p.*, 2 mg per animal every 2 wk.

Characterization of splenic populations by flow cytometry

A single cell suspension was prepared from half of each spleen and the total cell number determined by counting in a hemocytometer. To assess the proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells present, cells were stained with FITC-conjugated anti-CD3 (17A2) and PE-conjugated anti-CD4 (L3T4) or FITC-anti-CD4 and PE-anti-CD8 (Ly-2) Abs (all from PharMingen, San Diego, CA) and analyzed in a FACSort Apparatus (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

In vitro stimulation of splenic cells

Cells obtained from the spleens of each mouse were washed with HBSS, and the erythrocytes were lysed using a hemolytic solution (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , pH 7.2). Cells were then distributed in 96-well plates and incubated in triplicate in DMEM/10% FCS either with no further stimulus or in the presence of mycobacterial Ag (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Con A (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma). Supernatants from the cultures were collected after 3 days in culture, and quantification of the IFN- γ produced was done by ELISA. Mycobacterial Ag was prepared as described elsewhere (22). Briefly, the culture supernatant of *M. avium* 25291 SmT grown in Sauton medium was concentrated by ultrafiltration, precipitated with ammonium sulfate, and extensively dialysed against PBS.

Detection of IFN- γ in the serum and in culture supernatants

The measurement of IFN- γ was done using an ELISA method. R4-6A2 and biotinylated AN18 anti-IFN- γ mAbs were used as the capture and detection Abs, respectively. Recombinant IFN- γ from Genzyme was used as standard.

Histology

Portions of the livers of the infected mice were fixed in buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

Results

Growth of different strains of *M. avium* inside murine BMM ϕ

Most strains of *M. avium* grow exponentially inside unstimulated murine BMM ϕ , the growth rate being dependent on the particular strain of the bacterium. We have previously shown that when BMM ϕ were treated with IFN- γ and/or TNF- α , the intracellular growth of *M. avium* was restricted (3). However, we have not identified the mechanism underlying this cytokine-induced bacteriostasis. Since NO is a well-known antimicrobial mechanism of macrophages, we addressed the question of whether the IFN- γ - and TNF- α -induced mycobacteriostasis seen in BMM ϕ was mediated by NO. We took BMM ϕ from mice that do not express the

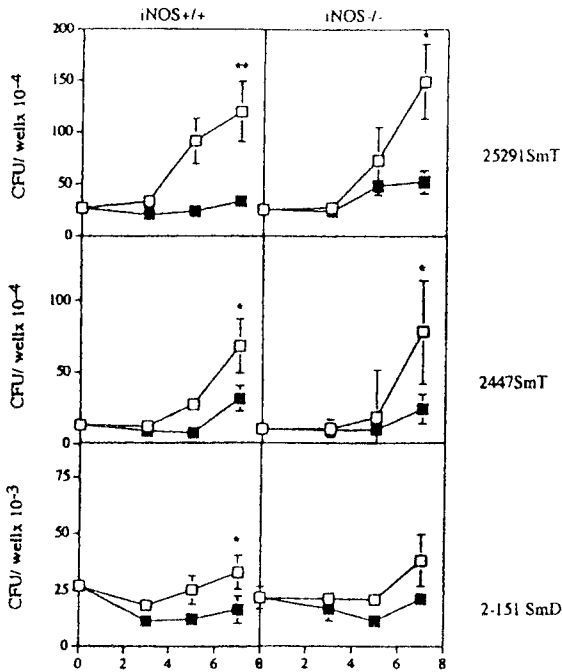


FIGURE 2. Effect of cytokine activation on the growth of three different strains of *M. avium* inside murine BMM ϕ . Macrophages derived from the bone marrow of 129Sv mice (left panels) or iNOS $-/-$ mice (right panels) were infected with *M. avium* of the strains shown and were left untreated (open squares) or were treated with 100 U of IFN- γ and 50 U of TNF- α per culture well and per day during the first 4 days of infection (closed squares). At different time points of infection, macrophages were lysed and intracellular bacteria quantified. The results shown are the average and SD of the number of CFU per well in three wells for each condition. Statistically significant differences in the number of CFU/well between treated and untreated cells, as evaluated by the Student's *t* test, are labeled *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

iNOS (iNOS $-/-$ mice) and infected them with different strains of *M. avium*, as described in *Materials and Methods*. The infected macrophages were then treated with 100 U of IFN- γ or 50 U of TNF- α per culture well and per day, both individually and in combination, during the first 4 days of infection. At different time points after infection, the cells were lysed and the number of bacteria quantified as CFU in agar medium. As control, iNOS-expressing macrophages we used BMM ϕ from the 129Sv strain. IFN- γ treatment led to growth inhibition of all three strains of *M. avium* tested in both types of macrophages (iNOS $+/+$ or iNOS $-/-$). TNF- α led to a more modest inhibitory effect, while the combination of the two cytokines was the most efficient stimulus to induce mycobacteriostasis. The results of treatment with IFN- γ plus TNF- α are shown in Fig. 2 and compared with untreated macrophages. While wild-type macrophages treated with IFN- γ plus TNF- α produced 55.3 ± 5.6 , 50.1 ± 2.1 , and 47.9 ± 1.6 nmol of NO $_2^-$ per mg of macrophage protein during infection by strains 25291 SmT, 2447 SmT, and 2-151 SmD, respectively, no nitrite was detectable in the culture supernatants of similarly treated macrophages from iNOS $-/-$ mice. It is clear from these data that macrophages can inhibit intracellular *M. avium* growth even if they are unable to produce NO.

In vivo growth of *M. avium* in mice lacking iNOS: role of IFN- γ

Since our *in vitro* results indicated that production of NO was not a key factor for the control of *M. avium* growth inside murine macrophages, we decided to investigate the capacity of iNOS-de-

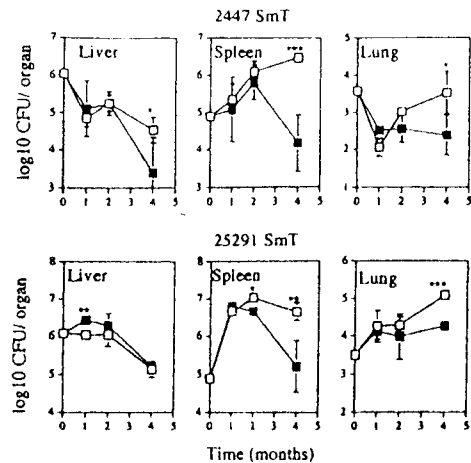


FIGURE 3. *In vivo* fate of *M. avium* strains 2447 SmT and 25291 SmT after i.v. inoculation into wild-type 129Sv mice (open symbols) or iNOS gene-disrupted mice (closed symbols). Each time point represents the geometric mean of CFU in the indicated organs of four mice and the SD. Statistically significant differences between the two groups of mice as evaluated by the Student's *t* test are labeled *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

ficient mice to control an *in vivo* infection by *M. avium*. As a control for iNOS $-/-$ mice, we used 129Sv mice, the strain used for the generation of the mutants. We infected them with two different strains of *M. avium*, namely strain 25291 SmT, which is virulent for mice, and strain 2447 SmT, which has a low virulence. At different time points after infection, we sacrificed four or five mice of each group and determined the number of CFU in their organs. The results are shown in Fig. 3. Mice lacking iNOS not only did not show an increased susceptibility to infection, but even controlled it more efficiently at late time points of infection. We also used a small cohort of iNOS $-/-$ that had been backcrossed to C57BL/6 background infecting them with *M. avium* 25291 SmT and using C57BL/6 mice as controls. At 10 wk of infection, the mycobacterial loads in the spleens, livers, and lungs of the iNOS $-/-$ were 8.2 ± 0.4 , 9.1 ± 0.5 , and 7.2 ± 0.3 log 10, respectively, as compared with 10.8 ± 0.1 , 10.7 ± 0.1 , and 8.5 ± 0.4 log 10 in the C57BL/6 organs.

Since IFN- γ is required for *in vivo* control of *M. avium* growth in wild-type mice (4, 23), we tested whether this cytokine was playing a role in the control of the *M. avium* infection in iNOS $-/-$ mice. Mice infected with *M. avium* 25291 SmT were treated with anti-IFN- γ mAbs or normal rat Ig and were sacrificed 4 mo after inoculation. As shown in Fig. 4A, mice treated with anti-IFN- γ F4 Abs showed increased bacterial multiplication as compared with control mice, particularly in the spleen and the lung, confirming that IFN- γ may mediate bacteriostasis independently of the secretion of NO.

Taken together, these results showed that iNOS $-/-$ mice are better able than iNOS $+/+$ mice to control an infection by virulent strains of *M. avium* and that IFN- γ is needed for that control. As the *in vitro* results had suggested, IFN- γ is probably activating the macrophages for intracellular growth restriction or killing of the bacteria, in an NO-independent way.

Differences in the immune response of iNOS-/- and iNOS+/+ mice

Since IFN- γ was shown to play such a critical role in the growth of *M. avium* in the mouse, we wanted to know if the difference in resistance between iNOS $-/-$ and control mice could be due to a

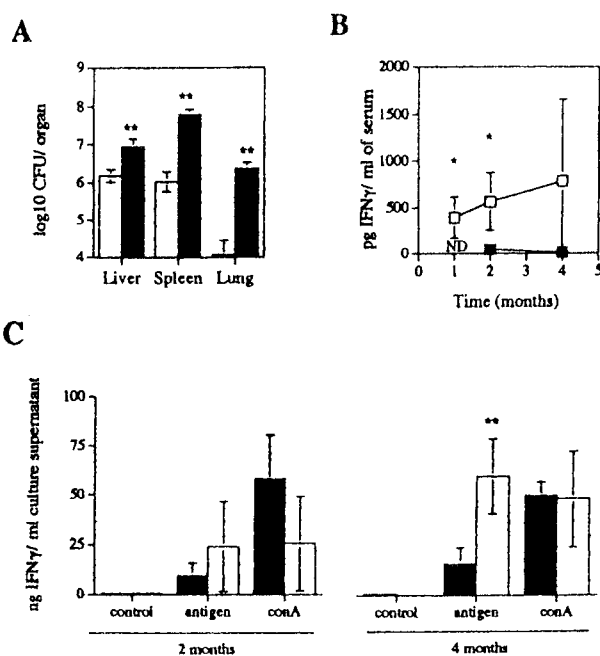


FIGURE 4. Role of IFN- γ in restriction of growth of *M. avium* 25291 SmT in the presence or absence of endogenous NO production. **A**, Effect of IFN- γ neutralization on the growth of *M. avium* in iNOS $^{-/-}$ mice infected i.v. with 10^6 CFU/animal and treated i.p. with anti-IFN- γ Abs (black bars) or nonimmune Ig (white bars) (2 mg/animal every 2 wk). Mice were sacrificed 4 mo after infection, and the bacterial burden in their organs was evaluated. The values shown represent the average and SD of the \log_{10} CFU/organ of three animals per group. **B**, IFN- γ present in the sera of infected mice. The values shown are pg of IFN- γ per ml of serum in iNOS $^{+/+}$ (closed squares) and iNOS $^{-/-}$ mice (open squares). ND, not detected. **C**, In vitro production of IFN- γ by splenic cells from iNOS $^{+/+}$ (black bars) and iNOS $^{-/-}$ mice (white bars) infected for 2 or 4 mo with *M. avium* 25291 SmT. Total splenic cells were cultured in vitro in the presence of *M. avium* Ag or Con A for 3 days. Supernatants were collected, and IFN- γ present was measured by ELISA. Values shown are the average and SD of the values found for four or five mice per group and are expressed as ng of IFN- γ per ml of culture supernatant. Statistically significant difference: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, applying the Student's t test.

different capacity to produce IFN- γ in vivo. To assess that, we measured the amount of IFN- γ in the sera of infected mice throughout the course of infection. In mice infected with *M. avium* 25291 SmT, a clear difference in the amounts of IFN- γ present in the serum was seen, with iNOS $^{-/-}$ mice showing at least 10 times more cytokine in the serum than their controls throughout the experiment (Fig. 4B). Uninfected mice of either strain had no detectable IFN- γ in their sera (data not shown).

To relate the differences in IFN- γ with the function and number of the producing cells, we initially studied the cell populations in the spleen during the course of infection with the 25291 SmT

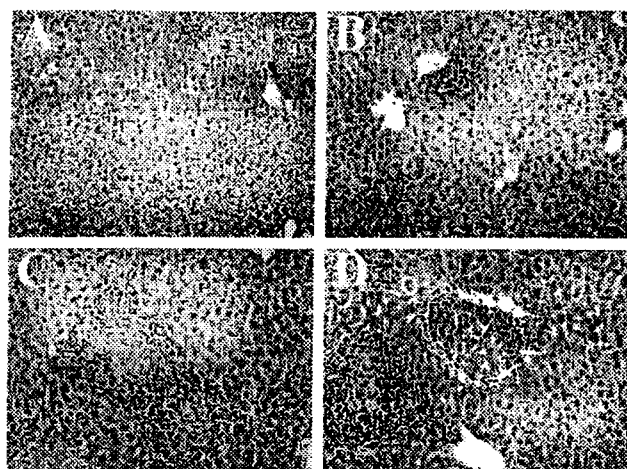


FIGURE 5. Histological analysis of granuloma formation in wild-type (**A** and **B**) and iNOS gene-disrupted mice (**C** and **D**) infected for 2 (**A** and **C**) or 4 mo (**B** and **D**) with *M. avium* 25291 SmT. Typical views of liver sections are shown.

strain of *M. avium*. As shown in Table I, the total cell numbers in the spleen were significantly higher in iNOS $^{-/-}$ mice than in iNOS $^{+/+}$ mice during the first 2 mo of infection. This difference was also found both among the CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells, as assessed by FACS analysis, although the results were not statistically significant. By month 4 of infection, however, the numbers of cells decreased markedly in the two strains of mice. At this late time point, the iNOS-deficient mice had significantly lower numbers of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells as compared to the wild-type controls. Throughout the time course of infection, there was no difference in the relative proportions of CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, and CD8 $^{+}$ cells in the spleens between the two strains of mice. To assess the state of differentiation of the T cells present in the spleens of infected mice, cell suspensions were prepared that were stimulated in vitro either with *M. avium*-secreted Ag or Con A, as described in *Materials and Methods*. After 3 days in culture, the supernatants were collected and assayed for IFN- γ . Splenic cells from iNOS $^{-/-}$ mice produced two to four times more IFN- γ than cells from iNOS $^{+/+}$ mice (Fig. 4C), a difference which could not be accounted for by alterations in the percentage of CD4 $^{+}$ T cells in the cultures (Table I). Ag stimulation of splenic cells from uninfected mice of either strain led to no detectable secretion of IFN- γ (data not shown).

Histological analysis of granuloma formation was done in liver sections at 2 and 4 mo of infection with *M. avium* 25291 SmT. As shown in Fig. 5, both the number of granulomas and their size were considerably higher in iNOS $^{-/-}$ as compared with their controls. Granulomas of the iNOS-deficient mice consisted of a well-structured core of epithelioid macrophages surrounded by an extensive mantle of lymphoid cells, whereas the organization of granulomas in wild-type mice was very incipient at both time

Table I. Cell populations $\times 10^6$ in the spleens of mice infected with *M. avium* 25291 SmT^a

	1 mo.		2 mo.		4 mo.	
	iNOS $^{+/+}$	iNOS $^{-/-}$	iNOS $^{+/+}$	iNOS $^{-/-}$	iNOS $^{+/+}$	iNOS $^{-/-}$
Total	77.0 \pm 8.3	122.5 \pm 22.4	135.6 \pm 9.0	259.6 \pm 46.7*	61.0 \pm 7.8	44.2 \pm 10.2
CD4 $^{+}$	17.5 \pm 3.1 (22.7%)	26.6 \pm 7.6 (21.7%)	31.2 \pm 4.1 (23.0%)	52.0 \pm 20.7 (20.0%)	8.1 \pm 1.4 (13.3%)	4.7 \pm 1.8* (10.6%)
CD8 $^{+}$	8.7 \pm 2.0 (11.3%)	11.0 \pm 5.9 (9.0%)	14.2 \pm 2.2 (10.5%)	20.3 \pm 7.3 (7.8%)	2.9 \pm 0.5 (4.8%)	1.2 \pm 0.4** (2.7%)

^a Statistical analysis was performed using the Student's t test. Statistically significant differences are labeled * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.001$.

points. No granulomatous inflammation or signs of any infectious disease were found in uninfected mice of either strain.

Discussion

Although NO has been identified as an important effector of microbial killing inside macrophages, we were previously unable to find such a role in the bacteriostasis of *M. avium* induced by cytokines acting on murine macrophages (3). We extended here those observations by showing that, after cytokine activation, macrophages obtained from iNOS-deficient animals exerted a degree of bacteriostasis of three strains of *M. avium* similar to that of macrophages from wild-type mice. Furthermore, not only were iNOS^{-/-} as resistant as wild-type animals to in vivo infection by *M. avium* during the initial 2 mo of infection, but also they became able to clear the mycobacteria at late time points of infection contrasting with the bacteriostasis found in the wild-type animals. It was already reported that iNOS^{-/-} mice were not more susceptible to infection by a virulent strain of *M. avium* (18). These authors, however, ended their study at around the second month of infection, failing to observe the improved clearance of *M. avium* that could have taken place beyond that period of time.

One could argue that the differences in mycobacterial growth between the two groups of animals in our experiments could be related to differences in genetic background other than the iNOS gene. We find this very unlikely for the following reasons. First, the *Nramp1* gene is the only gene identified so far to have a proven role in determining resistance to *M. avium* in murine models of infection. We screened our breeders of iNOS^{-/-} mice and found them to have the wild-type (resistant) allele of *Nramp1* gene in homozygosity. Therefore, our in vivo data were obtained by comparing infections of iNOS^{-/-} mice with the 129Sv strain, also harboring the wild-type allele of *Nramp1*. Second, 129Sv mice are naturally resistant to infection, and, therefore, the iNOS-deficient mice would be expected to be equally resistant or more susceptible to infection rather than more resistant as observed here. Third, the kinetics of the infection showed that the increased resistance of the knock-out mice was a late event, and there have been no such differences in resolution of infection reported for *M. avium* infections when comparing different strains of mice. However, this evidence cannot exclude the possibility that unidentified genes playing a role in determining resistance to *M. avium*, and present in distinct allelic forms in the strains used to obtain the iNOS-deficient animals, could underlie the different susceptibilities to infection observed here. Therefore, we started to backcross the iNOS^{-/-} strain to the C57BL/6 background, and, from a limited cohort of animals, we were able to confirm the data previously generated. It should, however, be stressed that great care should be taken when using recently generated gene-disrupted animals, as there is always a risk that data generated with those animals may depend as much on the genetically engineered deficiency as on unrelated genetic differences between the strains used in the studies.

Our data are consistent with the interpretation that NO produced during infection hampers the development or maintenance of the protective immune response. The numbers of lymphocytes present in the spleen were higher in iNOS^{-/-} mice than in the wild-type controls during the first mo of infection, including the CD4⁺ T cells, which are the cells required for the development of protective immunity against *M. avium* (4). When the latter cells were stimulated in vitro with the specific Ag, a higher production of IFN- γ was found among cells from infected iNOS^{-/-} mice than from the controls suggesting that there was a loss or reduction of differentiation of Ag-specific Th1 cells when mice had the ability

to produce NO in response to infection. Previous work done with T cell clones had suggested that NO has an inhibitory effect on IFN- γ production by Th1 cells (24). The fact that IFN- γ responses to a mitogen were not affected in the same way as the Ag-specific responses in our experiments means that the results with the mycobacterial Ag are not due to in vitro inhibitory effects of NO and suggests that the in vivo effects are most prominent on cells that are responding specifically to Ag rather than a general effect on the whole CD4⁺ T cell population. Furthermore, there was an in vivo correlate for these results, namely the amounts of serum IFN- γ detected throughout the infection, which were higher in the iNOS-deficient mice as compared with the controls. These results are consistent with those obtained by MacMicking et al. (13), who found higher levels of IFN- γ in the plasma of iNOS^{-/-} vs iNOS^{+/+} mice infected with *M. tuberculosis* at early time points of infection, when there were no significant differences in bacterial burdens in the organs of infected mice. The negative effect on protective immunity mediated by NO may be particularly evident in our model of infection due to the high resistance of *M. avium* to NO in contrast to other microbes. Data similar to ours have been recently reported for an influenza model of infection (19). In that study, both increased resistance and increased IFN- γ responses were found in iNOS^{-/-} mice as compared with control animals, showing that this scenario may be more than an odd occurrence.

At 4 mo of infection, we found a drastic reduction in the number of T cells in both strains of mice, showing that there are other mechanisms affecting the survival of these cells during an *M. avium* infection. However, despite the marked decrease in total CD4⁺ cells, the amount of IFN- γ induced by Ag stimulation remained high, suggesting that Ag-specific CD4⁺ T cells could survive this latter mechanism of T cell depletion or, alternatively, that these cells further differentiated into very high producers of the cytokine, allowing for a certain loss among them.

Work by other groups has already implicated NO in immunosuppression. Secondary immunosuppression following infection with attenuated *Salmonella typhimurium* was shown to be mediated by NO-dependent mechanisms associated with IFN- γ -activated macrophages (25). Likewise, activated macrophages from *Corynebacterium parvum*-treated rats were shown to inhibit lymphocyte proliferation driven by a mitogen through the production of NO (26). Similar NO-mediated inhibitory mechanisms were described for mouse resident peritoneal macrophages responsible for reducing mitogen-stimulated T cell proliferation (27). On the other hand, NO may regulate macrophage function in an autocrine/paracrine way, as illustrated by the down-modulation of IL-6 secretion in IFN- γ -treated, *Legionella pneumophila*-infected macrophages (28). Gregory et al. (29) showed, in addition, that NO could have a deleterious effect on the development of protective immune responses to *Listeria monocytogenes*, although there is still no consensus as to whether NO may be required for the control of experimental listeriosis (20, 31–33). A tight regulation of NO production appears to be fundamental for the host response. With *M. avium*, however, having no direct role in the killing of the mycobacteria, NO's role is just a deleterious one. It is still not clear whether its effects are due to a direct toxicity on T cells or to a more subtle regulatory role, such as the determination of the balance between the type of immune response (24). We have already described the state of unresponsiveness to unrelated Ags that develops during *M. avium* infection and the role played by the activated macrophages in this mechanism (33). We speculate that NO may be involved in such nonspecific immunosuppression.

Two of the immunological outcomes of the lack of NO synthesis were the increased production of IFN- γ and the increase in size and number of granulomas. The latter effect of NO depletion has

been described in other models, such as following pulmonary embolization with latex beads coupled to purified protein derivative in sensitized animals (34). It is unclear at the moment if the increased resistance to *M. avium* in iNOS^{-/-} mice is due to either of these effects or whether additional T cell-associated mechanisms may be the culprits of the late killing of *M. avium* seen in the iNOS-deficient mice. The organization of granulomata in mice, namely during mycobacterial infections, has been found different from that in humans. Our results suggest that NO may be related to this. In fact, NO production in human macrophages has been shown to be of a much lesser magnitude and, maybe for that reason, granulomas in man are better organized. We should also stress that we were able to detect differences in granuloma formation in iNOS^{-/-} mice as compared with the controls because they were matched for the allele of *Nramp1* they express. Otherwise, when comparing granuloma formation in the iNOS-deficient mouse strain (naturally resistant, expressing the G169 allele) to mice harboring the susceptible allele (D169), one would not have found such dramatic differences as bacterial growth would be faster in the wild-type but naturally susceptible animals as compared with the resistant ones, leading to bacterial loads able to trigger a more vigorous granuloma response.

In summary, we report here a counterprotective role for NO in an infectious model, the basis of which probably being related to its immunosuppressive effects. These data illustrate the double-edged sword nature of NO and the delicate equilibrium that should underlie its production. Also, the opposite effects of NO on the resistance of mice to two different mycobacterial species, namely *M. avium* and *M. tuberculosis*, emphasize the distinct nature of the strategies adopted by these pathogens to survive the host's antimicrobial machinery. Of relevance to human disease is the fact that *M. avium* infection is especially frequent in HIV-infected individuals, in whom it could cause, through NO production, a further deterioration of the already impaired T cell function.

Acknowledgments

We thank Drs. J. Mudgett, C. Nathan, and J. MacMicking for their gift of breeders of iNOS-KO mice; and A. Peixoto Ribeiro (Institute for the Biomedical Sciences, Porto, Portugal) for helpful technical assistance.

References

- Indertied, C. B., C. A. Kemper, and L. E. M. Bermudez. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:266.
- Holland, S. M. 1996. Host defense against nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Infect.* 11:217.
- Appelberg, R., and Orme, I. M. 1993. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology* 80:352.
- Appelberg, R., A. G. Castro, J. Pedrosa, R. A. Silva, I. M. Orme, and P. Minóprio. 1994. Role of γ interferon and tumor necrosis factor α during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* 62:3962.
- Sarmento, A. M., and R. Appelberg. 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in the tumor necrosis factor-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 64:3224.
- Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger, and D. G. Russell. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* 160:1290.
- Stuehr, D. J., and M. A. Marletta. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7738.
- Stuehr, D. J., and M. A. Marletta. 1987. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J. Immunol.* 139:518.
- Nathan, C. F., and J. B. Hibbs. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65.
- Fang, F. C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99:2818.
- Chan, J., Y. Xing, R. S. Magiozzo, and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175:1111.
- Chan, J., K. Tanaka, D. Carroll, J. Flynn, and B. R. Bloom. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:736.
- MacMicking, J. D., R. J. North, R. La Course, J. S. Mudgett, S. K. Shah, and C. F. Nathan. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5243.
- Flesch, I. E. A., and S. H. E. Kaufmann. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 59:3213.
- Bermudez, L. E. 1993. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages: the role of nitric oxide. *Clin. Immunol.* 91:277.
- 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.
- Sato, K., H. Tomioka, and H. Saito. 1992. Differential susceptibilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to sodium nitrite. *J. Clin. Microbiol.* 30:2994.
- Doherty, T. M., and A. Sher. 1997. Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* 158:4822.
- Karupiah, G., J. Chen, S. Mahalingam, C. F. Nathan, and J. D. MacMicking. 1998. Rapid interferon- γ -dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. *J. Exp. Med.* 188:1541.
- MacMicking, J. D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen, and J. S. Mudgett. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81:641.
- Medina, E., B. J. Rogerson, and R. J. North. 1996. The *Nramp1* antimicrobial resistance gene segregates independently of resistance to virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 88:479.
- Silva, R. A., T. F. Pais, and R. Appelberg. 1998. Evaluation of interleukin 12 in immunotherapy and vaccine design in experimental *Mycobacterium avium* infections. *J. Immunol.* 161:5578.
- Castro, A. G., P. Minóprio, and R. Appelberg. 1995. The relative impact of bacterial virulence and host genetic background on cytokine expression during *Mycobacterium avium* infection of mice. *Immunology* 85:556.
- Taylor-Robinson, A. W., F. Y. Liew, A. Severn, D. Xu, S. J. McSorley, P. Garside, J. Padron, and R. S. Phillips. 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.* 24:980.
- AJ-Ramadi, B. K., J. J. Meissler, D. Huang, and T. K. Eisenstein. 1992. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 22:2249.
- Denham, S., and I. J. Rowland. 1992. Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophages: the role of nitric oxide. *Clin. Exp. Immunol.* 87:157.
- Albina, J. E., J. A. Abate, and W. L. Henry. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation: role of IFN- γ in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.* 147:144.
- Yamamoto, Y., T. W. Klein, and H. Friedman. 1996. Immunoregulatory role of nitric oxide in *Legionella pneumophila*-infected macrophages. *Cell. Immunol.* 171:213.
- Gregory, S. H., E. J. Wing, R. A. Hoffman, and R. L. Simmons. 1993. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *J. Immunol.* 150:2901.
- Boockvar, K. S., D. L. Granger, R. M. Ponston, M. Maybodi, M. K. Washington, J. B. Hibbs, and R. L. Kurlander. 1994. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect. Immun.* 62:1089.
- 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.
- Samsom, J. N., J. A. M. Langermans, P. H. P. Groeneveld, and R. van Furth. 1996. Acquired resistance against a secondary infection with *Listeria monocytogenes* in mice is not dependent on reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 64:1197.
- Appelberg, R., R. Soares, P. Ferreira, and M. T. Silva. 1989. Induction of non-specific immunosuppression in mice by mycobacterial infections and its relation to macrophage activation. *Scand. J. Immunol.* 30:165.
- Hogaboam, C. M., S. W. Chensue, M. L. Steinhilber, G. B. Huffnagle, N. W. Lukacs, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1997. Alteration of the cytokine phenotype in an experimental lung granuloma model by inhibiting nitric oxide. *J. Immunol.* 159:5585.

Capítulo VII

"Effects of iron deprivation on *Mycobacterium avium* growth"

M. Salomé Gomes, Geneviève Dom, Jorge Pedrosa, Johan R. Boelaert e
Rui Appelberg

1999 Tubercle & Lung Disease. Aceite para publicação.

Effects of iron deprivation on *Mycobacterium avium* growth

M. Salomé Gomes¹, Geneviève Dom², Jorge Pedrosa¹, Johan R. Boelaert³ and Rui Appelberg¹

1-Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Portugal; 2-Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Catholic University of Louvain-la Neuve, Belgium; 3-Unit of Renal and Infectious Diseases, Algemeen Ziekenhuis Sint Jan, Brugge, Belgium

Correspondence:

Rui Appelberg, Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection,
Institute for Molecular and Cell Biology

Rua Campo Alegre 823, 4150-Porto, Portugal

Tel.# +351.2.6074952

FAX# +351.2.6099157

E-mail: rappelb@ibmc.up.pt

Supported in part by contract BMH4-97-2387 from the Commission of the European Communities, contract P/SAU 58/96 from PRAXIS XXI programme (Lisbon), and a grant from Abbott. Salomé Gomes receives a fellowship from the PRAXIS XXI programme.

Summary

Setting: Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) patients have increased iron deposition in different tissues which may favour the growth of *Mycobacterium avium*, a common bacterial opportunist in these patients.

Objective: To test whether reducing the iron loads in macrophages in vitro and in vivo reduces *M. avium* proliferation.

Design: Mycobacterial proliferation was evaluated in vitro either in axenic media or cultured macrophages and in vivo in mice after manipulation of the iron status.

Results: Three different compounds - desferrioxamine (DFO), N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (HBED) and a 1-amino-3-(2-bipyridyl)isoquinoline derivative (VUF8514) - were found to inhibit the growth of *M. avium* in axenic medium. DFO and HBED were also active in inhibiting the intramacrophagic growth of *M. avium*, while the use of VUF8514 was prevented by its toxicity towards the host cell. Both DFO and HBED enhanced the mycobacteriostatic effect induced in bone marrow derived macrophages by interferon gamma. In vivo, an iron poor diet led to reduced *M. avium* proliferation whereas the intraperitoneal administration of either DFO or HBED had small effects as they impacted little on the iron status of mice.

Conclusion: these results confirm that iron withholding is a means of inhibiting the growth of *M. avium*. In vitro data suggest that iron chelating compounds may be useful as adjunct therapy against *M. avium*, once their in vivo activity is optimized.

Introduction

Mycobacterium avium is a facultative intracellular bacterium that leads to one of the most common bacterial opportunistic infections in Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS) patients. Like any other organism, *M. avium* needs iron for its growth and it has been shown to synthesize two kinds of siderophores, in order to acquire iron from the environment: the cell wall-associated mycobactins and the structurally-related excreted molecules exochelins or carboxymycobactins^{1,2}. Consistent with the importance of these mechanisms, it has been observed that the growth of *M. avium* is enhanced in vivo in situations of iron excess⁴ and inhibited in vitro when iron is unavailable due to the presence of serum apotransferrin⁵. Moreover, we have recently illustrated the importance of iron in the course of murine *M. avium* infection, studying the mechanism of action of the *Nramp1* gene product⁶. Our results and those of others strongly suggested that *Nramp1*, one of the most important genes controlling murine resistance against *M. avium*, was linked to iron transport inside macrophages.

AIDS patients have altered iron metabolism, resulting in increased iron deposition in different types of tissues and cells, including macrophages⁷, the cells that harbor *M. avium* inside the host. This excess of iron may favour the growth of *M. avium* and other opportunistic infectious agents. In AIDS patients, *M. avium* infection has been reported to be significantly associated with increased hepatic iron levels⁸. For that reason, lowering the iron burden of the patients may be beneficial and iron chelating compounds may be useful as adjunct therapy against *M. avium*.

Desferrioxamine (DFO) is the only iron chelator widely used in human therapy, but it has several limitations, one of them being the need for parenteral administration. Other iron chelating compounds are currently being tested for their usefulness in the treatment of iron overload. Two

promising groups of compounds are those of hydroxypyridinones, some of which are being studied in clinical trials⁹, and N,N'-bis(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (HBED) or its prodrugs¹⁰.

There has been only one report, in abstract form, that DFO can inhibit both intracellular and extracellular growth of *M. avium*¹¹ and another report that the 1-amino-3-(2-bipyridyl)isoquinoline derivative VUF-8514 inhibits the extracellular growth of *M. avium*¹². It was subsequently reported that the latter compound has iron-chelating properties¹³.

In the present work, we tested these and other iron chelating compounds for their effect on *M. avium* growth, both in axenic medium and inside murine bone marrow derived macrophages. Since the growth of *M. avium* inside these macrophages is restricted when the cells are treated with interferon gamma (IFN γ)¹⁴ and as there are some suggestions that the antimicrobial effect of IFN γ involves the limitation of availability of iron¹⁵, we tested whether the IFN γ effect could be enhanced by the addition of an iron chelator. In order to further evaluate the usefulness of iron deprivation on anti-*M. avium* treatment, we compared the effect of a low iron diet leading to severe iron deficiency and the effect of DFO or HBED administration on the mycobacterial growth in the mouse. The results obtained may help to devise appropriate iron chelation therapy to be used as adjuvant treatment against *M. avium* in AIDS patients.

Materials and Methods

Bacteria

Mycobacterium avium strain 25291 forming smooth transparent colonies (SmT) (obtained from American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) were expanded in Middlebrook 7H9 medium (Difco, Detroit, MI), collected when in mid-log phase, centrifuged, washed twice with saline containing 0.04% Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO), resuspended in the same solution, briefly sonicated, diluted in aliquots at 10^9 CFU/ml and stored at -80°C until needed. Just before use, an aliquot was quickly thawed and diluted to the appropriate concentration.

Axenic medium

"Basal defined medium"¹⁶ was used, with pH adjusted to 6.5. This medium contains $1.4\ \mu\text{M}$ of iron (ferrous sulfate and ferric nitrate, 60:1). A classical broth microdilution method was used. In brief, solutions of the chelators at different concentrations (90 μl) were mixed with 10 μl of the bacterial inoculum so that 100 μl of the final bacterial suspension contained 3×10^6 bacteria and 1 μl of the Middlebrook 7H9 medium (which contains $150\ \mu\text{M}$ ferric ammonium citrate). The final iron concentration in the medium was therefore $4.5\ \mu\text{M}$. The wells were incubated at 37°C and MIC evaluation was done after 15 days. The MIC was measured by two different techniques^{17, 18}: scoring the macroscopic growth (visual method) and CFU determination after plating of an aliquot onto 7H11 agar plates (Difco) and colony counting after 3 to 5 weeks. Mycobacterial growth was assessed in the presence of increasing chelator concentrations and the MIC_{50} was the chelator concentration that reduced the mycobacterial growth by 50% as extrapolated from the data generated.

Bone marrow derived macrophages (BMM \emptyset)

Macrophages were derived from the bone marrow of BALB/c mice as follows. Each femur was flushed with 5 ml of Hank's Balanced Salt Solution

(HBSS). The resulting cell suspension was centrifuged and the cells resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Paisley, UK) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and 10% L929 Cell Conditioned Medium (LCCM), as a source of Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF). The iron content of DMEM is 0.25 μM Fe(III). The FBS added contributes with 3 μM of iron, according to supplier's information, the form of which is unknown, although probably bound to transferrin. The cells were distributed in 24-well plates and incubated at 37°C in a 7% CO₂ atmosphere. Three days after seeding, another 0.1 ml of LCCM were added. On the 7th day, the medium was renewed. The cells were used on the 10th day of culture, when fully differentiated into macrophages.

Macrophage viability studies

The numbers of viable adherent cells per culture well were determined as described elsewhere¹⁹. Briefly, after aspirating the culture medium, the adherent cells were incubated for 10 minutes with Protease Type XXV (Sigma), 2.5 mg/ml, to digest any dead cells. Next, Cetrimide (Sigma) was added to lyse the viable cells and a suspension of the cell nuclei was obtained. The number of nuclei was then counted using a Neubauer chamber.

Infection of bone marrow derived macrophages

On the 10th day of culture, macrophages in each well were incubated with 10⁶ CFU of *Mycobacterium avium* 25291 SmT per culture well, for 4 hours at 37°C in a CO₂ atmosphere. Cells were washed with warm HBSS to remove non-internalized bacteria and reincubated in DMEM, with 10% FBS and 10% LCCM. In some of the wells, the macrophages were immediately lysed and the number of viable intracellular bacteria counted as described below (time zero). The other cells were incubated during 7 days to measure the intracellular growth of the bacteria.

In some of the experiments, macrophages were treated with murine recombinant Interferon-gamma (Genzyme, Cambridge, MA), 100 units per culture well per day, from day zero to day 4 of infection.

Quantification of *M. avium* growth inside BMMØ

The measurement of mycobacterial growth was done by counting colony forming units. Briefly, 7 days after infection, the cells were lysed by adding 0.1% Saponin to each well, a procedure which does not affect mycobacterial viability. The resulting macrophage lysate was serially diluted 1:10 in water containing 0.04% tween 80. The dilutions were plated on Middlebrook 7H10 agar (Difco) and the number of colonies counted 8 to 10 days later. For each condition tested, three culture wells were used. The results presented correspond to the mean of these three wells. Before the lysis, macrophage monolayers were checked microscopically for the presence of extracellular bacterial growth and discarded when that happened. In some of the experiments, the supernatants were plated in agar medium and the number of CFUs found was less than 1% of that found inside the macrophages.

Iron chelators

Chelators used in these studies are shown in Table 1. DFO is the commercially available desferrioxamine mesylate (Desferal[®], Novartis, Basel, Switzerland). HBED and 2,3-DHB were kindly provided by Dr R.W.Grady (New York Hospital, New York, New York). L1 (also referred to as deferiprone) was kindly provided by Dr Stembert (Duchefa NV, Haarlem, the Netherlands). VUF-8514 was kindly provided by Dr. H. van der Goot (Vrije Universiteit, Amsterdam, the Netherlands). dDFT was kindly provided by Prof. R.R. Crichton (University of Louvain-la-Neuve, Belgium).

In vivo infection

C57BL/6 +/+ and C57BL/6 bg/bg were bred in our facilities. C57BL/6 bg/bg mice were kept in HEPA-filter-bearing cages and given sterilized food and water. The other animals were kept in standard hygiene conditions, fed commercial chow and given acidified water ad libitum. Dietary iron deficiency was obtained by placing the mice in a low iron diet (Carfil, Oud-Turnhout, Belgium) containing 6.7 mg of iron/kg and demineralized water two weeks before the infection as well as throughout the period of infection. For testing the iron chelators, mice were injected intraperitoneally with DFO, 8mg/day or HBED, 1.5mg/day, starting 2 days before infection and continued until their sacrifice. Infection was done by intravenous injection of a mycobacterial suspension, containing about 10^6 *M. avium* 2447 SmT, in saline. At the end of the experiments, animals were sacrificed, their livers, lungs and spleens were homogenized and serial dilutions of the resulting suspensions were plated in Middlebrook 7H10 medium and the bacterial colonies counted after culture for 10 days at 37°C.

Hematologic studies

The hematocrit was studied by centrifuging a blood sample in a capillary tube and comparing the volume of the packed erythrocyte pellet with the total blood volume. Serum iron and unsaturated iron binding capacity (UIBC) were measured with a colorimetric assay (Roche Diagnostics-Boehringer-Manheim). Total iron binding capacity (TIBC) was calculated as the sum of serum iron and UIBC. Serum transferrin was measured with a nephelometric assay (Behring Diagnostics).

Results

Studies in axenic medium

As shown in Table 2, the effect of iron chelators on the growth of *M. avium* in an axenic medium was dependent on the type of chelator used. DFO, the reference compound, exerted a modest inhibitory activity, as was the case for HBED. VUF-8514 resulted in a stronger decrease in growth. The three other chelators tested had no activity towards *M. avium*. Both assessment techniques used, the visual method and the CFU method, were in good agreement. To confirm the role of chelation in the antimicrobial activity of the different compounds, we added stoichiometric amounts of iron (FeCl_3 for the ferric chelators and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ for VUF8514) to the chelators. When ferrated chelators were used, the growth-reducing activities of DFO, HBED and VUF-8514 were abrogated (data not shown).

Studies with murine bone marrow derived macrophages

M. avium 25291 ST grows exponentially inside BMMØ, resulting in close to a ten-fold (one \log_{10}) increase in their numbers in 7 days. In this study, we added different iron chelating compounds to the culture medium immediately after infection and measured the intramacrophagic growth of *M. avium* 25291 ST in 7 days.

The presence of the iron chelators diminished the viability of the macrophages. Therefore, we chose to study the highest non-toxic concentration determined for each of them. We counted the number of viable adherent macrophages at the end of the 7 days of infection and considered that the chelator was not toxic if in its presence there were at least 80% of the number of macrophages found in control untreated wells. The highest non-toxic concentration corresponded approximately to the one that chelates 30 μM of iron for all the compounds tested with the exception of VUF-8514, for which the highest non-toxic concentration was the one that chelates 7 nM of iron. These were the concentrations used in all the

subsequent experiments using BMMØ. When the compounds were saturated with iron prior to addition to the cultures, no toxic effects were observed towards the macrophages, indicating that their toxicity was directly related to iron deprivation of the cells.

Each chelator was tested in 3 to 6 independent experiments. The effect of each chelator on the intramacrophagic growth of *M. avium* was very variable between experiments, as shown in Figure 1. The presence of the chelator led either to an increase or a decrease in mycobacterial growth according to the compound studied. In the case of HBED and of DFO, the effect was inhibitory in all the experiments, the number of CFUs per well being on average 75 and 62% of control wells, respectively.

Since the iron chelating compounds could lose activity during the 7 days of culture, a different set of experiments was designed where the chelators were added every two days after infection. No significant changes in the results were obtained using this procedure (data not shown). When the chelators were saturated with iron prior to the addition to the culture, no inhibitory effect on *M. avium* growth was seen (data not shown).

Since the intramacrophagic growth of *M. avium* is inhibited when the macrophages are treated with IFN γ during the infection, we tested whether this cytokine was more active in the presence of an iron chelator. In three different experiments, we treated infected macrophages with both IFN γ (100U/ well/ day, from day 0 to day 4 of infection) and HBED (30 μ M every other day, from day 0 to day 4). In one additional experiment, infected macrophages were treated with IFN γ as above plus DFO added at 30 μ M immediately after infection. As shown in Table 3, the addition of the iron chelator increased the inhibitory effect of IFN γ . It may also be seen that whereas the effect of HBED alone was significantly inhibitory only in one of the three experiments, this iron chelator consistently enhanced mycobacteriostasis of IFN γ -activated macrophages in all three experiments.

In vivo studies

To test in vivo whether iron deprivation could contribute to the control of *M. avium* growth, we measured the growth of *M. avium* in animals fed with a low iron diet versus animals fed normal chow. We took both the immunodeficient beige mice and their congenic immunocompetent strain C57Bl/6. Beige mice are mutants with defects in the activity of several leukocytes and have increased susceptibility to *M. avium* infection^{4,16} being sometimes used as a model of AIDS. Starting two weeks before infection, we fed them either a low iron diet or normal chow. Mice were infected with the intermediate virulence *M. avium* strain 2447ST. Four weeks later, they were sacrificed and the bacterial burdens in their organs were evaluated as were their hematological status. The results are shown in Table 4. Animals kept under a low iron diet showed serological signs of iron deficiency, namely low transferrin saturation, low total iron and ferritin, as well as a low hematocrit, as compared with animals fed normal chow. In parallel, the \log_{10} increase in the number of *M. avium* CFUs per organ was lower in mice kept under low iron, as compared with normally fed animals.

Once we knew that iron deprivation leads to a slower growth of *M. avium* in vivo, we wanted to know if the iron chelating compounds that showed inhibitory activity towards *M. avium* in our in vitro systems could exert some inhibitory effect also in vivo.

In order to test the efficacy of DFO in vivo, we administered this iron chelator intraperitoneally to *M. avium* infected mice, using 8mg/animal/day, a dose previously described to be effective in inhibiting the growth of *Pneumocystis carinii*²⁰. DFO treatment was started two days before infection and continued until the end of the experiment, 17 days after infection. As can be seen in Figure 2, DFO caused a 0.5 \log_{10} decrease in the mycobacterial number in the spleens of beige mice, but not in the other

organs examined. In C57Bl/6 mice DFO had no effect on *M. avium* growth (data not shown).

We repeated the experiment described above, this time including also animals treated with HBED, the other chelator that had a significant effect in in vitro cultures. HBED was administered by intraperitoneal injection of 1.5 mg of drug per animal every day, starting two days before infection.

In this second experiment, both chelators had a very limited and not statistically significant effect on *M. avium* growth. When we measured the serological parameters related to the iron status of these animals, we found that they were not affected by the treatments, indicating that for some reason the iron chelating compounds were not effective in inducing iron deprivation in these non-iron-overloaded animals (data not shown).

Discussion

Iron chelation as a means of depriving microorganisms of nutritionally essential iron in order to inhibit their growth is not a new concept and the in vitro and in vivo growth of many microbes was shown to be restricted by DFO²¹. This concept of iron chelator-induced microbiostasis has only been tested clinically in the case of malaria caused by *Plasmodium falciparum*. In this setting, DFO was shown to increase the clearance of parasitemia and to hasten the recovery from coma²². In the present work, we studied in vitro the effect of different molecules that chelate iron on the growth of *M. avium*, cultivated in an axenic medium or inside murine macrophages. Out of the 6 iron chelating compounds tested, 3 showed some mycobacteriostatic activity in the axenic medium: DFO, HBED and VUF-8514. Interestingly, these 3 compounds belong to different chemical families. DFO is a trihydroxamate and HBED an ethylenediamine derivative, both being chelators of iron in its ferric state. The bipyridyl derivative VUF-8514²³, in

contrast, binds ferrous iron¹³. The lack of effect of 2,3-DHB may be due to its intrinsically lower iron chelating properties. It is unclear why the hydroxypyridone derivative L1 (deferiprone), that avidly binds iron, does not inhibit *M. avium* growth, as we previously used it to restrict the in vitro growth of some other bacteria²⁴.

Each of the compounds was also tested in 3 to 6 different experiments with *M. avium* infected bone marrow derived murine macrophages. The results obtained were very variable between experiments, probably reflecting small changes in the iron status of the macrophages after 10 days in culture or in the culture medium composition. In each individual experiment, some of the compounds showed an inhibitory effect while others promoted *M. avium* growth. The fact that some of the iron chelators increased *M. avium* growth, instead of inhibiting it, as would be expected, may signify that they are supplying iron to the mycobacterium, by promoting the transport of the metal to the inside of the infected cell and allowing *M. avium* siderophores to acquire it. In contrast with the results obtained in axenic medium, VUF-8514 did not show a consistent inhibitory effect when tested in macrophages. This is probably due to the low concentration used, limited by the high toxicity that this compound exerted on the cells. Similar to what happened in the axenic medium, DFO and HBED showed an inhibitory effect on *M. avium* growth inside bone marrow derived macrophages. These results indicated that these two compounds could be of interest to be further tested in vivo against *M. avium*.

It is well known that IFN γ restricts the growth of *M. avium* within the macrophage¹⁴. One of the mechanisms that has been invoked to explain this effect is the restriction of iron availability, by virtue of the downregulation of the expression of the transferrin receptors at the cellular surface¹⁵. Incubation with an iron chelator might also result in intracellular restriction of iron, without interfering with the expression of the transferrin receptor

but due to direct chelation of iron in the "labile iron pool". We therefore tested whether iron chelation might have an additive effect with IFN γ . HBED and DFO were found to increase the mycobacteriostatic effect induced in macrophages by IFN γ . This indicates that the iron chelator may potentiate the protective effects of the immune response of the host to the infection.

M. avium grows more extensively when iron is more available as shown by studies in which its growth is enhanced by treating mice with an excess of this element^{4,6} and also suggested by the correlation between *M. avium* infection and hepatic iron overload in AIDS patients⁸. In the present work we show the first evidence that *M. avium* growth can be restricted in vivo by iron deprivation, induced by a low iron diet. The treatment of mice with iron chelating drugs, however, did not result in reproducible inhibitory effect on *M. avium* growth. The lack of a consistent effect of HBED and DFO on the *M. avium* growth in vivo can result from a failure of these drugs in reducing the amount of iron in mice. We measured the serological indicators of the iron status of treated animals and found that neither DFO or HBED caused a significant iron deficiency. The stability of DFO in plasma is very different between species. While in man close to 100% of the drug remains stable after 3 hours of incubation with plasma at 37°C, in the presence of mouse plasma, more than 50% of the drug is degraded in the first hour and it completely disappears after 3 hours²⁵. We adopted the dosage and protocol of administration of DFO used by Weinberg²⁰ to treat *P. carinii* infected mice. In that study, the author found a significant decrease in the growth of the parasite, although the iron status of the animals was not concomitantly studied. As for HBED we injected, in a daily basis, the same amount used in a single dose in a study conducted to compare the excretion of iron induced in mice by DFO or HBED¹⁰. HBED was found to be more potent than DFO in that respect. However, when HBED is given to

mice daily in doses up to 200 mg/Kg, it does not cause a significant sustained iron deficiency in the mouse (Robert W. O'Grady, personal communication). Taken together, these data suggest that neither of these iron chelating compounds is effective in maintaining a mouse in a low iron status during enough time to control a slowly evolving infection like *M. avium*. On the other hand, most iron chelators currently used or in development are aimed to be effective in the treatment of iron overload in β -thalassemic patients. These patients, at least if not transfused, have iron accumulation predominantly in parenchymal cells and not macrophages. This could also explain why these chelators have little effect in vivo in a situation that demands iron deprivation of the macrophage²⁶.

In conclusion, the present work supports the concept of "iron withholding" as a means of restricting bacterial growth²⁷. This may be particularly relevant to *M. avium*, whose unrestricted growth in AIDS patients may be facilitated not only by the severely compromised cellular immunity, but also by the iron accumulation demonstrated in the macrophages of those patients^{7,8}. The design of new chelators should however take into account the role of the macrophage in both iron homeostasis and control of infections.

Acknowledgments

We would like to thank Prof. Yves-Jacques Schneider (Laboratory of Cellular Biochemistry, University of Louvain-la-Neuve, Belgium), as well as Dr Maryse Dufaux-Fauville (Pasteur Institute, Brussels, Belgium), in whose laboratories Geneviève Dom performed parts of this work. The authors are equally grateful to Dr. R. Hider for information on the affinities of the compounds tested.

References

1. Barclay R, Ratledge C. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J. Bacteriol.* (1983) **153**: 1138-1146.
2. Wong DK, Gobin J, Horwitz MA, Gibson BW. Characterization of exochelin of *Mycobacterium avium*: evidence for saturated and unsaturated and for acid and ester forms. *J. Bacteriol.* (1996) **178**: 6394-6398.
3. Gobin J, Horwitz MA. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J. Exp. Med.* (1996) **183**:1527-1532.
4. Dhople A, Ibanez MA, Poirier TC. Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios* (1996) **87**: 77-87.
5. Douvas GS, May MH, Crowle AJ. Transferrin, iron and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J. Infect. Dis.* (1993) **167**:857-864.
6. Gomes MS, Appelberg R. Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology* (1998) **95**: 165-168.
7. Boelaert JR, Weinberg GA, Weinberg ED. Altered iron metabolism in HIV infection: mechanisms, possible consequences and proposals for management. *Infect. Agent Dis.* (1996) **5**: 36-46.
8. Al-Khafaji B, Kralovic S, Smith RD. Increased hepatic iron in the acquired immunodeficiency syndrome: an autopsy study. *Modern Pathology* (1997) **10**: 474-480.
9. Brittenham GM. Development of iron chelating agents for clinical use. *Blood* (1992) **80**: 569-574.

10. Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM. HBED: a potential alternative to desferrioxamine for iron-chelating therapy. *Blood* (1998) **91**: 1446-1452.
11. Lambrecht RS, Mjanger AK. Iron availability alters extracellular and intracellular replication of *Mycobacterium avium*. *Abstracts of the Annual Meeting of American Society for Microbiology, Washington DC, abstr nr U-70* (1993).
12. Dhople AM, Dhople AA, Ibanez MA. In vitro activity of 2,2'-bipyridyl analogues against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* (1995) **76**: 136-140.
13. Newman SL, Gootee L, Stroobant V, van der Goot H, Boelaert JR. Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* yeast cells in human macrophages by the iron chelator VUF 8514 and comparison of VUF 8514 with desferrioxamine. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1995) **39**: 1824-1829.
14. Appelberg R, Orme IM. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology* (1993) **80**: 352-359.
15. Byrd T, Horwitz MA. Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J. Clin. Invest.* (1989) **83**: 1457-1465.
16. Schneider Y-J. Optimization of hybridoma cell growth and of monoclonal antibody secretion in a chemically defined serum and protein-free culture medium. *J. Immunol. Methods* (1989) **116**: 65-77.
17. Wallace RS, Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *J. Clin. Microbiol.* (1986) **24**: 976-981.
18. Yajko DM, Nassos PS, Hadley WK. Broth microdilution testing of susceptibility to 30 antimicrobial agents of *Mycobacterium avium* strains from patients with AIDS. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1987) **31**: 1579-1584.

19. Stewart CC. Murine mononuclear phagocytes from Bone Marrow. In: Adams DO, Edelson PJ, Koren H, *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*. New York: Academic Press (1981) p. 5-20.
20. Weinberg GA. Iron chelators as therapeutic agents against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1994) **38**: 997-1003.
21. Boelaert JR, de Locht M, Van Cutsem J. Desferrioxamine: its effects on the growth of microorganisms in vitro and in experimental infections. *Rev. Med. Microbiol.* (1993) **4**: 171-175.
22. Gordeuk VR, Thuma P, Brittenham G et al. Effects of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *New England J. Med.* (1992) **327**:1473-1477.
23. De Zwart MAH, van der Goot H, Timmerman H. Synthesis of copper-dependent antimycoplasmal activity of 1-amino-3-(2-pyridyl) isoquinoline derivatives.2.Amidines. *J. Med. Chem.* (1989) **32**: 487-493.
24. De Brauwer E, Van Landuyt HW, Gordts B, Boelaert JR. In vitro acquisition of iron from the iron-desferrioxamine complex by *Aeromonas hydrophila*. *Clin. Microbiol. Infection* (1996) **1**: 273-274.
25. Steward AWI, Madigan T, Bretnall A, Hassan IF. An improved animal model for studying desferrioxamine. *Brit. J. Haematol* (1996). **95**: 654-659.
26. Gordeuk VR, McLaren GD, Samowitz W. Etiologies, consequences, and treatment of iron overload. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* (1994) **31**: 89-133.
27. Weinberg E. Iron and Infection. *Microbiol. Rev.* (1978) **42**: 45-66.

Legends to the figures

Figure 1- Growth of *Mycobacterium avium* inside bone marrow derived macrophages (BMMØ) cultured in the presence of different iron chelators. All chelators were added at the concentration of 30µM, except for VUF-8514, used at 7 nM. Values represent the number of intramacrophagic bacteria per culture well, 7 days after the infection, as the percentage of the colony forming units (CFU) per well found in untreated cells. For a given compound, each circle represents the result of one experiment.

Figure 2- Growth of *M. avium* 2447SmT in the indicated organs of C57Bl/6 bg/bg mice treated with Desferrioxamine (DFO) (closed bars) or saline (open bars). Data indicate the log₁₀ colony forming units (CFU)/ organ at day 30 of infection. The reduction in mycobacterial growth induced in the spleen by treatment was statistically significant (p<0.05).

Table 1- List of compounds tested in the present study.

		MW (a)	Molecules of chelator/ atom of iron	Kf (b)	pM (c)
DFO	Desferrioxamine	657	1	30.6	26.6
HBED	N,N'bis(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N'-diacetic acid	388	1	39.7	31.0
L1	1,2-dimethyl-3-hydroxypyridin-4- one	139	3	36.0	20.0
2,3-DHB	2,3-dihydroxybenzoic acid	154	3	40.0	15.0
dDFT	desmethyl-desferrithiocin	246	2	29.7	21.0
VUF-8514	derivative of 1-amino-3-(2- bipyridyl)isoquinoline	340	2	N.A.	N.A.

(a) Molecular weight.

(b) Kf is the formation constant for the chelate.

(c) pM is the negative log of the metal ion concentration at pH 7.4 when the total concentration of metal is 1 μ M and the total concentration of ligand is 10 μ M.

(d) N.A., not available.

Table 2- Mean MIC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) value obtained with the different iron chelators, when assessed in an axenic medium by both a visual method and a CFU method

	Visual method	CFU method
DFO	16.5	19.2
L1	>300	>300
HBED	33	43.5
2,3-DHB	100	N.D.
d-DFT	150	N.D.
VUF-8514	3.0	1.1

Table 3- HBED and DFO enhance the mycobacteriostatic effect of Interferon-gamma (IFN γ)-treated macrophages.

	Control	HBED	IFN γ	HBED+ IFN γ
exp 1	1.0 (6.1 \pm 0.07)	0.8 (5.9 \pm 0.04) ^b	0.25 (5.35 \pm 0.03) ^c	0.1 (5.2 \pm 0.19) ^c
exp 2	0.65 (6.1 \pm 0.04)	0.65 (6.1 \pm 0.08)	0.45 (5.9 \pm 0.06) ^b	0.25 (5.7 \pm 0.05) ^c
exp 3	0.7 (5.8 \pm 0.05)	0.65 (5.75 \pm 0.05)	0.5 (5.6 \pm 0.08) ^a	0.4 (5.5 \pm 0.01) ^c
	Control	DFO	IFN γ	DFO+ IFN γ
exp 4	1.5 (7.11 \pm 0.05)	1.04 (6.65 \pm 0.04) ^c	1.05 (6.66 \pm 0.01) ^c	0.63 (6.24 \pm 0.09) ^c

Bone marrow-derived macrophages were infected with *M. avium* and treated with IFN γ and HBED or DFO as described in materials and methods. The values shown, from independent experiments, represent the log₁₀ increase in CFU/well between day zero and day 7 and in parenthesis, the log₁₀ CFUs per well at day 7. Statistical analysis was performed using the Student's t test and the results from the comparison between treated and untreated groups of three wells are shown as a) for p<0.05, b) for p<0.01 and c) for p<0.001.

Table 4- Effects of iron deprivation by low iron diet on the hematologic parameters and susceptibility to infection by *M. avium* 2447SmT.

	Hematologic parameters*					log ₁₀ increase CFU/ organ		
	Ht (%)	FRT (µg/L)	Fe (µg%)	TIBC (µg%)	Sat (%)	Liver	Spleen	Lung
Bg control	42	259	162	529	31	1.4	2.4	2.1
Bg diet	36	141	69	522	13	1.2	2.1	1.6
C57Bl/6 contr.	42	164	145	570	25	1.0	2.0	0.8
C57Bl/6 diet	35	78	95	500	19	0.6	1.6	0.0

*The following parameters were studied in the blood or sera of infected mice: hematocrit (Ht), total ferritin (FRT), serum iron (Fe), total iron-binding capacity (TIBC), and transferrin saturation (Sat).

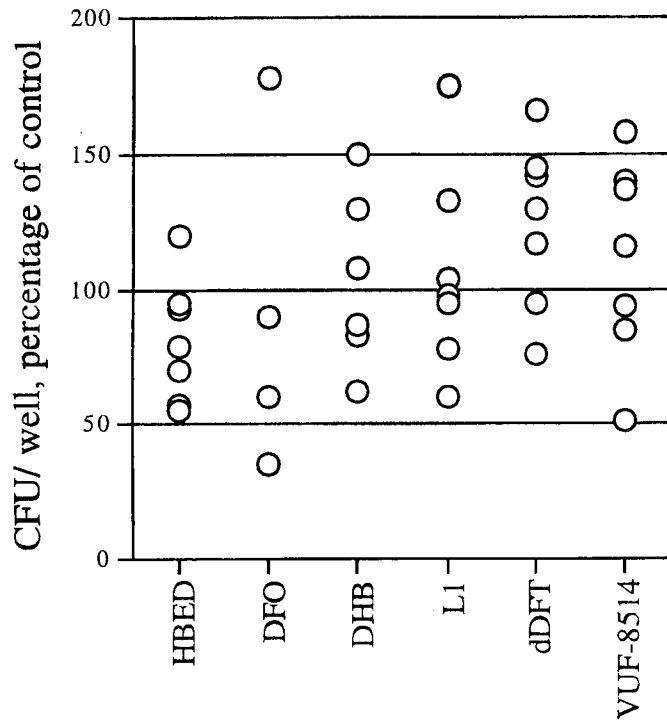


Fig-1

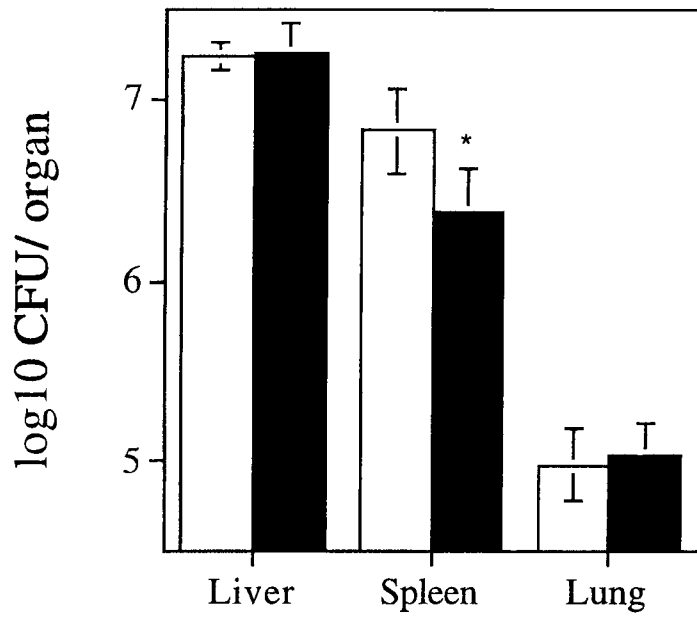


Fig-2

Capítulo VIII

"Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*."

M. Salomé Gomes e Rui Appelberg

Immunology, 1998, vol. 95, pág. 165-168.

Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*

M. S. GOMES & R. APPELBERG *Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Portugal*

SUMMARY

In the mouse, the progression of the *Mycobacterium avium* infection is highly dependent on the *Nramp1* gene. Strains of mice that express the *Nramp1*^{D169} allele are highly susceptible to *M. avium* infections, while *Nramp1*^{G169} strains of mice can control them. Recently, the *Nramp1* gene has been cloned and characterized as coding a transmembrane protein, probably involved in divalent cation transport. One possible function of this protein could be the transport of iron out of the parasite-harboring phagosome. Previous work in our lab has shown both *in vitro* (in macrophage cultures) and *in vivo*, that the growth rate of *M. avium* is highly dependent on the amount of iron available in the system. To try to correlate this with the *Nramp1* gene function, BALB/c (susceptible) and C.D2 (resistant) congenic mice were treated for 20 days with different doses of iron-dextran, so as to induce different degrees of iron overload, and infected with *M. avium* 2447. Iron administration increased *M. avium* growth in infected organs in a dose-dependent manner at the same time as it decreased the difference in mycobacterial growth between the two mouse strains. These results indicate that an excess of iron hampers *Nramp1*-encoded function, strongly suggesting a direct involvement of the *Nramp1*-encoded protein in the transport of this cation.

Mycobacterium avium is a facultative intracellular parasite that leads to one of the most common bacterial opportunistic infections in acquired immune-deficiency syndrome (AIDS) patients. Valuable data for the understanding of the biology of *M. avium* infection has been obtained using the mouse model of experimental infection. Different strains of mice show different susceptibilities to *M. avium* infection and, although more than one gene is involved in determining resistance or susceptibility to infection, one of the most important in that respect is the *Nramp1* gene^{1,2} (formerly known as the *Bcg*, *Lsh* or *Ity* genes), a gene involved in macrophage-mediated resistance to a number of different intracellular pathogens, namely *Leishmania donovani*, *Salmonella typhimurium* and certain strains of *Mycobacterium bovis*.^{3,4} *Nramp1* has two allelic forms, one expressing an aspartate at position 169 (D169, *Bcg*^s) and another expressing glycine at that position (G169, *Bcg*^r), which confer susceptibility or resistance respectively, to infection by those pathogens.⁵

Recently, the study of polymorphisms in the human *Nramp1* gene has shown a correlation between some of these polymorphisms and increased susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. leprae*^{6,7} although other studies on human patients

infected with *M. avium*, *M. tuberculosis* or *M. leprae* have failed to find such a correlation.⁸⁻¹⁰

Following the isolation and cloning of the *Nramp1* gene in 1993,⁵ its expression has been found to be exclusive to professional phagocytes and regulated by lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ).¹¹ It codes for an integral membrane protein that is recruited to the membrane of phagosomes,¹² and bears an N-terminal SH3-binding domain.¹³ Mice bearing the D169 allele of the *Nramp1* gene appear to have a deficient function or expression and/or membrane integration of the protein,¹⁴ and behave as the null mutants generated by homologous recombination.¹⁵ Regarding the function of the *Nramp1*-encoded protein, there is a strong case for a role in cation transport mediated by this product. Homology between *Nramp1* and microbial transport proteins was first identified by Vidal *et al.*⁵ and homology to a yeast manganese transporter was later described by Supek *et al.*¹⁶ More recently, it was found that the *Nramp1*-encoded protein shares a high homology to two other proteins, coded by the mouse *Nramp2* gene, and by a rat homologue provisionally named *DCT1* that is implicated in the membrane transport of divalent cations, namely of iron,¹⁷⁻¹⁹ at the level of the gut. It is not known, however, how the putative *Nramp1* transport function is related to the resistance to infection.

Iron is an essential nutrient for all living organisms, including microbial pathogens. The growth of *M. avium* in the mouse is strongly dependent on the availability of iron, being

Received 29 April 1998; revised 29 July 1998; accepted 29 July 1998.

Correspondence: Dr R. Appelberg, Laboratory of Microbiology and Immunology of Infection, Institute for Molecular and Cell Biology, Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal.

enhanced in situations of iron excess (ref. 20 and our own unpublished observations) and slightly decreased in the presence of iron chelators.²¹ The growth of *M. avium* can be restricted *in vitro*, both in axenic medium and in murine macrophage cultures, in the presence of iron chelators, and increased when extra iron is added.²¹⁻²³

In this context, one possible function of the *Nramp1*-encoded protein could be the transport of iron out of the *M. avium*-bearing phagosome, thus depriving the organism of this essential nutrient and preventing its growth. Were this the case, the resistant macrophage would then harbour a more efficient iron-pumping system than the susceptible macrophage. One would also be able to speculate that overloading the phagocytic cells with iron would overcome the advantage conferred by the more efficient pumping system and, eventually, macrophages expressing either of the proteins would handle *M. avium* similarly. To test this hypothesis, we used two congenic strains of mice, BALB/c and C.D2, differing in the *Nramp1* allele they express and treated them with different doses of a complex of iron-dextran by injecting it intraperitoneally on alternate days for 20 days (a total of 10 administrations), so as to induce different degrees of iron overload in their tissues. Control mice received dextran of similar molecular mass. They were then infected with 10^6 colony-forming units (CFU) of *M. avium* strain 2447 (growing as smooth transparent colonies) after the last injection of iron-dextran or dextran alone. One month later, the animals were killed and the bacterial loads were evaluated in the livers, spleens and lungs (Fig. 1). At that time point of infection, resistant animals had 0.8–1.4 \log_{10} less mycobacteria in their organs than susceptible mice. The treatment with iron increased *M. avium* growth in all organs and in both strains of mice in a dose-dependent manner, but did so more markedly in resistant mice than in the susceptible mice. Thus, as the iron load was increased the differences in mycobacterial proliferation between the two mouse strains became progressively smaller

such that in those animals that received the higher dose of iron (a total of 12 mg/animal) the difference in liver CFU between the two strains of mice was only 0.2 \log_{10} as compared with 1.0 \log_{10} in control animals. In the other organs, a similar picture was seen: in the spleen, control mice had a 1.4 \log_{10} difference in bacterial load depending on the *Nramp1* allele they express, but only 0.8 \log_{10} difference if they were severely iron overloaded, and in the lungs the differences were 0.7 and 0.2 \log_{10} respectively.

Paraffin-embedded sections of liver tissue were stained using the Perl's method to qualitatively detect accumulated iron. As can be seen in Fig. 2, the use of increasing doses of iron-dextran led to the corresponding increase in the accumulation of the metal in the liver, preferentially inside Kupffer cells and macrophages in granulomas.

The same experiment was repeated using mice that were thymectomized and depleted of CD4⁺ T cells. As shown in Table 1, growth of *M. avium* during 30 days in the organs of control (dextran-treated) BALB/c mice was higher than that in the organs of control C.D2. Iron overloading with an iron total dose of 12 mg per animal increased mycobacterial growth in both strains of mice but much more so in C.D2 mice, reducing the differences in mycobacterial growth exhibited by the two mouse strains. These data exclude an effect of iron overloading on the acquired immune response to *M. avium* and support the hypothesis that iron is hampering the innate immunity mediated by the product of the *Nramp1* gene.

This work has shown that in a situation of excess of iron, *Nramp1*^{G169} (*Bcg*^s) mice lose their advantage over *Nramp1*^{D169} (*Bcg*^s) mice in the control of *M. avium* infection. These data are consistent with our initial hypothesis, namely that *Nramp1* exerts its anti-microbial action by transporting iron out of the *M. avium*-bearing phagosome, depriving the organism of this nutritionally essential element. Thus, we may envisage that in untreated animals with low levels of iron within macrophages, the fully active *Nramp1*^{G169} protein is able to withhold iron

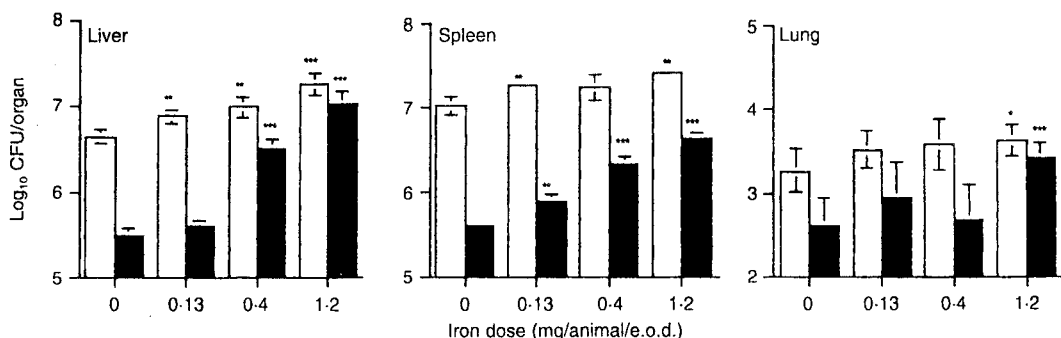


Figure 1. Differential increase in *M. avium* proliferation induced by iron overloading in BALB/c (*Nramp1*^{D169}, *Bcg*^s) mice (purchased from Gulbenkian Science Institute, Oeiras, Portugal) and congenic C.D2 (*BALB/c.Bcg*^s) mice (bred in our facilities from a pair supplied by Dr Emile Skamene). To induce a systemic iron overload, groups of five mice were injected on alternate days, by the intraperitoneal route, with 10 doses of 0.13, 0.4 or 1.2 mg of iron in the form of the ferric hydroxide-dextran complex (Sigma, St Louis, MO), starting 20 days prior to infection. All three groups received the same amount of dextran. A group of control mice from each strain received the same amount of uncomplexed dextran. Mice were intravenously infected with 10^6 CFU of *M. avium* 2447 (ref. 2). Thirty days later, the mice were killed, their livers, spleens and lungs homogenized, and serial dilutions plated in Middlebrook 7H10 agar medium (Difco Labs, Detroit, MI). Bacterial colonies were counted after incubation for 10 days at 37°. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and the results of the comparison of iron-treated vs. untreated mice is shown as * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$ and *** for $P < 0.001$. Using the same method, the differences between BALB/c and CD2 mice were found to be significant ($P < 0.05$) for all the situations shown, except for the lungs of the animals receiving the highest dose of iron.

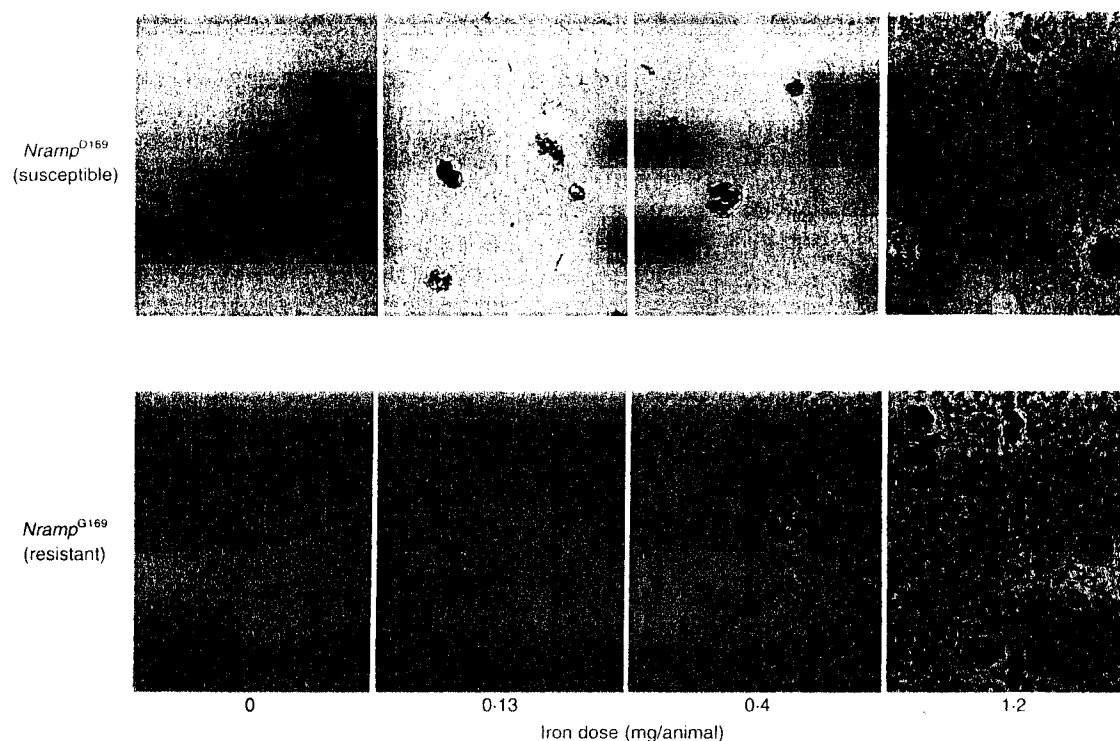


Figure 2. Liver tissue sections from the mice infected for 30 days with *M. avium* and treated with the indicated doses of iron-dextran, as described in the text, were stained by the Perl's method for the detection of iron.

Table 1. Total number of CFU (in \log_{10}) in the organs of CD4-depleted BALB/c and C.D2 mice that were given 10 doses of 1.2 mg of iron in the form of iron-dextran or dextran alone for a 20-day period prior to i.v. infection with 10^6 CFU of *M. avium* 2447. Mice were killed on day 30 of infection

Animals*	Liver		Spleen		Lung	
	Dextran	Iron loaded	Dextran	Iron loaded	Dextran	Iron loaded
BALB/c	7.13 \pm 0.12	7.55 \pm 0.07	7.37 \pm 0.09	7.40 \pm 0.16	3.34 \pm 0.15	3.48 \pm 0.29
C.D2	5.87 \pm 0.32	7.20 \pm 0.11	5.72 \pm 0.16	6.72 \pm 0.10	1.98 \pm 0.52	3.14 \pm 0.44
Δ †	1.26	0.35	1.65	0.68	1.36	0.34

*Mice were thymectomized at 4 weeks of age, allowed to recover for three weeks and were given either dextran or iron-dextran on alternate days for 20 days. All groups were then infected and given one dose of 0.2 mg of anti-CD4 monoclonal antibody (GK1.5 cell line) on days 0, 10 and 20 of infection, by intravenous injection.

† \log_{10} differences between CFU values in BALB/c and C.D2 in each group.

from the *M. avium*-containing phagosome, while *Nramp1*^{D169} is not, resulting in a faster growth of *M. avium* in the mice bearing the latter. However, when iron levels increase, the iron withholding capacity of *Nramp1*^{G169} is overcome and iron reaches the phagosome in high enough quantities to allow growth of *M. avium* at rates similar to those found in *Nramp1*^{D169}-bearing susceptible mice.

Although one might argue (in relation to our experiments) that iron may be inhibiting the action of *Nramp1* in some way other than saturating its transport function, or that it may be downregulating *Nramp1* expression,²⁴ namely since a putative iron-responsive element exists in the homologous *Dct1* gene¹⁷ and that deferoxamine treatment of murine macrophages altered the expression of the putative 65 000 MW *Nramp1* protein,²⁵ we feel that there is already considerable evidence supporting our initial hypothesis. Thus, the studies by Gunshin *et al.*¹⁷ clearly showed that the expression of the *Nramp1*

homologue *Dct1* in *Xenopus* oocytes was responsible for the transmembrane transport of iron ions as well as other divalent cations. More importantly, Atkinson & Barton²⁶ have transiently expressed the G169 form of the *Nramp1* cDNA in COS-1 cells and found that such ectopic expression of the wild-type protein led to important alterations in the accumulation of iron in the transfected cells.

In conclusion, we showed here that there is a close link between the mechanism of *Nramp1*-mediated resistance to *M. avium* infection and iron. Furthermore, taking into account information that has recently been published on biochemical studies, we strongly argue for a role of the *Nramp1* product as an iron pump that depletes the phagosomal compartments of this nutrient and leads to starvation of the pathogen of this essential cation. We therefore present data linking iron transport directly to control of mycobacterial proliferation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible in part by a grant from the European Community (Concerted action contract no. BMH4-97-2387), and contracts P/SAU 58/96 from the PRAXIS XXI programme (Lisbon) and AI-41922 from the NIH (USA). M. Salomé Gomes receives a fellowship from Programa Praxis XXI, 2^o Quadro Comunitário de Apoio. The authors are indebted to A. Peixoto Ribeiro (Institute for the Biomedical Sciences 'Abel Salazar', University of Porto, Portugal) for helpful technical assistance.

REFERENCES

- APPELBERG R. & SARMENTO A.M. (1990) The role of macrophage activation and of Bcg-encoded function (s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clin Exp Immunol* **80**, 324.
- CASTRO A.G., MINÓPRIO P. & APPELBERG R. (1995) The relative impact of bacterial virulence and host genetic background on cytokine expression during *Mycobacterium avium* infection of mice. *Immunology* **85**, 556.
- BLACKWELL J.M., BARTON C.H., WHITE J.K. *et al.* (1994) Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg story continues. *Immunol Lett* **43**, 99.
- SKAMENE E. (1994) The Bcg gene story. *Immunobiology* **191**, 451.
- VIDAL S., 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.
- BELLAMY R., RUWENDE C., CORRAH T., MCADAM K., WHITTLE H.C. & HILL A. (1998) Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in west africans. *N Engl J Med* **338**, 640.
- ABEL L., SANCHEZ F.O., OBERH J. *et al.* (1998) Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. *J Infect Dis* **177**, 133.
- HUANG J.H., OEFNER P.J., ADI V. *et al.* (1998) Analysis of the *NRAMP1* and *IFN-γR1* genes in women with *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 377.
- BLACKWELL J.M. (1998) Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasitol* **28**, 21.
- BLACKWELL J.M., BLACK G.F., PEACOCK C.S. *et al.* (1997) Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Phil. Trans R Soc Lond B* **352**, 1331.
- GOVONI G., GAUTHIER S., BILLIA F., ISCOVE N.N. & GROS P. (1997) Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* **62**, 277.
- GRUENHEID S., PINNER E., DESJARDINS M. & GROS P. (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* **185**, 717.
- BARTON C.H., WHITE J.K., ROACH T.I.A. & BLACKWELL J.M. (1994) NH₂-terminal sequence of macrophage-expressed natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) encodes a proline/serine-rich putative *Src* homology 3-binding domain. *J Exp Med* **179**, 1683.
- VIDAL S.M., PINNER E., LEPAGE P., GUTHIER S. & GROS P. (1996) Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1*^{D169}) mouse strains. *J Immunol* **157**, 3559.
- VIDAL S.M., TREMBLAY M.L., GOVONI G. *et al.* (1995) The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med* **182**, 655.
- SUPEK F., SUPEKOVA L., NELSON H. & NELSON N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5105.
- GUNSHIN H., MACKENZIE B., BERGER U.V. *et al.* (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482.
- FLEMING M., TRENOR C.C. III, SU M.A. *et al.* (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* **16**, 383.
- FLEMING M.D., ROMANO M.A., SU M.A., GARRICK L.M., GARRICK M.D. & ANDREWS N.C. (1998) *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1148.
- DHOPLÉ A.M., IBANEZ M.A. & POIRIER T.C. (1996) Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios* **87**, 77.
- GOMES S., DOM G., PEDROSA J., BOELAERT J. & APPELBERG R. (1998) Effects of iron chelation on *Mycobacterium avium* growth.
- LAMBRECHT R. & MJANGER A.K. (1993) *Iron availability alters extracellular and intracellular replication of Mycobacterium avium*. Abstract no. U-70, Abstracts of the Annual Meeting of American Society for Microbiology, Washington DC.
- DHOPLÉ A.M., DHOPLÉ A.A. & IBANEZ M.A. (1995) *In vitro* activities of 2,2'-bipyridyl analogues against *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* **76**, 136.
- ZWILLING B.S., LAFUSE W. & BROWN D.H. (1996) Mycobacterial resistance, mRNA stabilization, intracellular iron and the function of *Nramp1*. *J Leukoc Biol (Suppl) Abstract* **93**, 28.
- ATKINSON P.G.P., BLACKWELL J.M. & BARTON C.H. (1997) *Nramp1* locus encodes a 65 kDa interferon-γ-inducible protein in murine macrophages. *Biochem J* **325**, 779.
- ATKINSON P.G.P. & BARTON C.H. (1998) Ectopic expression of *Nramp1* in COS-1 cells modulates iron accumulation. *FEBS Lett* **423**, 239.

Quarta Parte

Discussão

Capítulo IX

Discussão

No início destes trabalhos, propusémo-nos entender quais dos potenciais mecanismos antimicrobianos do macrófago são importantes para o controlo da infecção por *M. avium* no ratinho. Os resultados das experiências descritas na Terceira Parte sugerem que todos os mecanismos conhecidos são relativamente ineficazes. Assim, o *M. avium* sobrevive ao ambiente ácido de um compartimento de características semelhantes a um fagolisossoma e, para além da resistência já conhecida às espécies reactivas de oxigénio, exhibe resistência à produção de monóxido de azoto (NO), que aliás se revela prejudicial à resposta imune do hospedeiro. Emergem, no entanto, dos trabalhos descritos, alguns indícios de que a retenção de ferro, um mecanismo potencialmente bacteriostático, mas ainda pouco compreendido, poderá ter uma importância central no controlo da infecção pelo *M. avium*.

A resistência do *M. avium* a vários agentes potencialmente tóxicos não é muito surpreendente dada a constituição da sua parede. A grande quantidade de lípidos que contém torna-a extremamente impermeável, como é sabido há muito, nomeadamente quando se tenta desenvolver antibióticos para tratar as infecções por esta micobactéria (Inderlied et al, 1993). Por outro lado, o tipo de lípidos presentes, torna-a resistente à actividade oxidante de espécies reactivas de oxigénio (Chan et al, 1989, Yuan et al, 1995). Se estes factores são comuns a outras espécies patogénicas de micobactérias, já são aparentemente próprias do *M. avium* as resistências ao pH baixo e à acção do NO. Nestas duas vertentes, o *M. avium* difere daquela que é a espécie de micobactérias

mais patogénica para o Homem, o *M. tuberculosis*. A razão destas diferenças, residindo provavelmente em diferenças discretas na composição das paredes destas duas bactérias, não é ainda conhecida. O *M. avium* parece ter-se adaptado melhor a condições ambientais diversas e potencialmente desfavoráveis do que o *M. tuberculosis*, como aliás é patente no facto de ser isolado frequentemente do ambiente, nomeadamente de meios aquáticos, de pH baixo e mesmo das águas de consumo, apesar da presença de desinfectantes.

Talvez mais relevante do que a observação de que o crescimento do *M. avium* no interior de macrófagos *in vitro* não depende da produção ou não de NO, é o facto de ratinhos incapazes de produzir NO indutivelmente (iNOS^{-/-}) serem mais resistentes do que os ratinhos normais à infecção por *M. avium*. Os dados apresentados no capítulo VI indicam que a activação da iNOS, que é muito acentuada durante a infecção por *M. avium* (Flórido et al, 1999), tem um efeito supressor sobre as células T. Os granulomas formados no fígado dos animais infectados são melhor organizados e maiores nos animais iNOS^{-/-}. Também no baço, o número total de células, assim como o de células T CD4⁺ em particular, é maior nos animais deficientes na iNOS. Estes dados indicam que o NO produzido pelos animais normais pode ter pelo menos dois efeitos: ou inibe o recrutamento de células T para os locais da infecção ou induz a apoptose dessas células nos mesmos locais. Vários estudos haviam previamente revelado que o NO libertado por macrófagos infectados com diferentes microrganismos pode ter efeitos supressores sobre as células T (Al-Ramadi et al, 1992, Denham et al, 1992, Albina et al, 1991, Yamamoto et al, 1996, Gregory et al, 1993). Recentemente, foi mostrado que, num modelo de doença auto-imune, mediada por células T, a estimulação da produção de grandes quantidades de NO pelos macrófagos, através da administração de IL-

12, levou à apoptose dessas células T e consequente remissão da doença. Este estudo constitui um exemplo em que a administração de IL-12 teve paradoxalmente um efeito protector numa doença auto-imune mediada por células T (Tarrant et al, 1999). Por outro lado, o NO poderá regular o recrutamento de células do sistema imune, como é sugerido num modelo experimental de formação de granuloma no pulmão. A inibição da produção de NO levou a um aumento do número de células presentes no granuloma. Os autores sugerem que este efeito é devido à presença do NO na circulação sanguínea, que diminui a expressão de moléculas de adesão à superfície das células endoteliais, logo a migração dos leucócitos (Hogaboam et al, 1997). Encontra-se ainda nos nossos dados uma correlação entre a ausência de iNOS e o aumento da quantidade de IFN γ presente no soro dos animais infectados, assim como da quantidade de IFN γ produzida por esplenócitos activados com antigénios micobacterianos. A mesma observação foi feita por outros autores quando infectaram ratinhos geneticamente deficientes na iNOS com *M. tuberculosis* (MacMicking et al, 1997), com o vírus Influenza A (Karupiah et al, 1998) ou com *Leishmania major* (Wei et al, 1995). Estudos feitos com linhas celulares haviam já revelado que o NO pode inibir especificamente a produção de citocinas do tipo Th1 pelos linfócitos T, favorecendo uma resposta do tipo Th2 (Taylor-Robinson et al, 1994). Este desvio da resposta T para Th2 poderá ser resultado da inibição pelo NO da produção de IL-12 por parte do macrófago. De facto, a produção de IL-12 pelos macrófagos, em resposta a diferentes estímulos, é reduzida pela adição de dadores de NO e aumentada na presença de NMMA ou em macrófagos iNOS $^{-/-}$ (Huang et al, 1998). Os autores destes estudos sugerem que o NO exerce um papel de contenção da resposta Th1, ou seja, depois de ter havido o desenvolvimento das células Th1, a produção de IFN γ e consequente activação do macrófago

para exercer as suas acções efectoras, o NO libertado pelo macrófago iria constituir um meio de inibir a resposta T, evitando que ela se expanda ao ponto de causar dano nos tecidos do hospedeiro. Enquanto este processo pode ser de facto eficaz em situações de infecção por microrganismos que sejam sensíveis à acção tóxica do NO, no caso do *M. avium*, o efeito imunossupressor do NO começa a exercer-se muito antes de o macrófago ter conseguido controlar o crescimento da bactéria e contribui portanto para a sua persistência.

A produção de NO por macrófagos humanos activados não foi fácil de detectar, acumulando-se durante vários anos publicações com dados contraditórios sobre a existência ou não deste mecanismo antimicrobiano no Homem (revisto por Kröncke et al, 1998, Groote & Fang, 1995, Schoedon et al, 1995, Denis, 1994). Embora a convicção actual seja a de que de facto os macrófagos humanos são capazes de activar a iNOS e produzir NO em resposta a determinados estímulos, tudo indica que essa produção seja desencadeada em situações mais restritas e em quantidades inferiores àquelas produzidas por macrófagos de ratinho (Kröncke et al, 1998, Nicholson et al, 1996, Weinberg et al, 1995). Tendo em conta que a infecção humana por *M. avium* afecta maioritariamente indivíduos com SIDA, a libertação de NO pelos macrófagos infectados e consequente acção supressora sobre os linfócitos T poderá contribuir para o agravamento da imunodeficiência destes indivíduos. Por outro lado, embora constituam terapias promissoras, o tratamento de indivíduos infectados com *M. avium* com citocinas como o IFN γ e a IL-12 deverá revestir-se de algumas precauções. No estudo de vacinas contra tumores, a administração de IL-12 como possível adjuvante revelou-se contraproducente pelo efeito imunossupressor do NO libertado em consequência da acção desta citocina. Só a administração de um inibidor da produção de NO em

conjunto com a IL-12 permitiu o desenvolvimento da imunidade em relação ao tumor (Koblish et al, 1998). Assim, também no caso das infecções por *M. avium*, em particular em indivíduos imunodeprimidos e quando se inclui a terapia com citocinas, poderá ser de considerar a inclusão de inibidores da produção de NO nos esquemas terapêuticos, de forma a obter toda a estimulação da resposta T de que o macrófago precisa para resolver a infecção.

A necessidade de células T para o controlo da infecção pelo *M. avium* no ratinho é portanto evidente, conforme é patente no parágrafo anterior e havia já sido descrito no capítulo II. É também evidente que o papel destas células passa pela produção de citocinas activadoras do macrófago e em especial IFN γ (Orme et al, 1992, Appelberg et al, 1994, Saunders & Cheers, 1995). É, no entanto, de notar que o tratamento de macrófagos isolados com IFN γ ou a associação desta com outras citocinas, resulta na inibição do crescimento intramacrofágico do *M. avium*, mas não em significativa morte da bactéria (Appelberg & Orme, 1993, ver também capítulos V-2, VI e VII), não explicando portanto a resolução da infecção. Pelo menos duas interpretações alternativas existem para este facto: ou as doses e as combinações de citocinas usadas nos modelos in vitro não correspondem aos estímulos encontrados pelos macrófagos in vivo (é muito difícil, se não impossível, fazer uma correcta avaliação do que se está a passar de facto in vivo) ou para uma eficaz eliminação do *M. avium* é necessária, para além da actividade de citocinas activadoras, a interacção directa dos macrófagos com outras células presentes no granuloma, nomeadamente linfócitos T. Trabalhos realizados com macrófagos humanos (com os quais tem sido ainda mais difícil estabelecer o efeito do IFN γ sobre o crescimento intracelular de micobactérias) indicam que de facto o contacto do macrófago com outros leucócitos aumenta a sua capacidade

de restringir o crescimento, ou mesmo matar, o *M. tuberculosis*. Este efeito foi visto quer com células T CD8⁺ (Stenger et al, 1997), quer com células não aderentes totais do sangue periférico (Bonecini-Almeida et al, 1998, Silver et al, 1998). Neste último caso, o efeito activador sobre os macrófagos foi atribuído quer a células CD4⁺, quer a células não T (Silver et al, 1998). Também em macrófagos peritoneais de ratinho, a adição de células T CD4⁺ aumenta a actividade antimicrobiana, quer contra o protozoário *Leishmania major*, quer contra o *Mycobacterium bovis* BCG (Sypek et al, 1991, Sypek et al, 1993). Os mecanismos pelos quais este contacto célula a célula poderá aumentar a capacidade anti-microbiana do macrófago não estão esclarecidos, mas poderão existir pelo menos dois tipos de interacção: a ligação entre moléculas de superfície do macrófago e seus ligandos na superfície dos linfócitos, com consequente modulação da actividade antimicrobiana do macrófago ou a morte do macrófago infectado pela acção citotóxica do linfócito.

Uma das primeiras moléculas a que foi atribuído um papel na activação dos macrófagos por contacto com as células T foi o TNF α membranar, já que o efeito activador das células T era maior nas células com maior expressão desta molécula à superfície e era inibido por anticorpos anti-TNF α (Sypek et al, 1991, Sypek et al, 1993). Não é claro como é que esta interacção aumenta a capacidade anti-microbiana do macrófago. Outra interacção importante é a do CD40 à superfície do macrófago com o CD40-ligando, expresso à superfície de células T activadas. A ligação entre estas duas moléculas induz uma resposta pró-inflamatória por parte do macrófago, com a produção de IL-1 β e TNF α , assim como de monóxido de azoto (Stout et al, 1996, Poe et al, 1997). A ligação CD40/CD40L está também associada a uma protecção dos monócitos em relação à apoptose (Suttles et al, 1996, Poe et al,

1997). A ligação de CD23 solúvel ao CD11b ou CD11c à superfície do macrófago leva também à produção por este último de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF α , assim como à produção de monóxido de azoto e peróxido de hidrogénio. O CD23 é expresso em várias células de origem hematopoiética, nomeadamente monócitos, plaquetas, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos B e T (Lecoanet-Henchoz et al, 1995). Também a ligação do CD69 à superfície do macrófago leva ao aumento da síntese de metabolitos do ácido araquidónico e de óxido nítrico (de Maria et al, 1994), enquanto que a ligação das moléculas LFA-3, CD44 e CD45 induz a produção de IL-1 β e TNF α (Webb et al, 1990). Qualquer uma destas moléculas tem ligandos potenciais à superfície de células T e as alterações a que dão origem podem modular a capacidade antimicrobiana do macrófago.

A actividade citotóxica das células T sobre os macrófagos pode ser exercida por duas vias: a interacção do Fas-ligando, expresso à superfície do linfócito, com o Fas-receptor, à superfície do macrófago, ou a desgranulação e conseqüente libertação de perforina e granulisina (Ashany et al, 1995, Stenger et al, 1997). Stenger et al observaram que quando os macrófagos-alvo estavam infectados com *M. tuberculosis*, a morte via Fas não teve qualquer efeito inibitório sobre a bactéria, enquanto que a morte via perforina causou a diminuição do número de bactérias intracelulares. Estes resultados contrastam de certo modo com os de Oddo et al, que induziram a apoptose de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* usando Fas-ligando solúvel e observaram morte intracelular da bactéria (Oddo et al, 1998). Vários trabalhos sugerem que quando entra em apoptose, mas não quando morre por necrose, o macrófago poderá eliminar as micobactérias presentes no seu interior. Monócitos humanos são capazes de matar *M. bovis* BCG intracelular quando entram em apoptose induzida por ATP (Molloy et al, 1994). O

mesmo tipo de célula mata o *M. avium* quando é induzida a sua apoptose por peróxido de hidrogénio, mas não quando a apoptose é induzida por anticorpo anti-Fas (Laochumroonvorapong et al, 1996). Estes últimos resultados, embora contribuam para a elaboração de um modelo atraente de eliminação das micobactérias no interior dos granulomas, foram obtidos usando agentes de apoptose pouco fisiológicos e continua por esclarecer se o processo ocorre de facto in vivo.

Em ratinhos de estirpes naturalmente susceptíveis, o desenvolvimento de uma resposta linfocitária T eficaz, embora resulte sempre no controlo do crescimento do *M. avium*, não leva à eliminação das bactérias, a não ser de estirpes de virulência muito baixa. A eliminação de *M. avium* de virulência intermédia ou alta só é conseguida em ratinhos portadores do alelo G169 do gene *Nramp1* (ver, por exemplo, Castro et al, 1995). Estes ratinhos perdem no entanto a capacidade de eliminar o *M. avium* se tiverem excesso de ferro nos seus tecidos, o que, juntamente com dados provenientes do estudo de moléculas homólogas à proteína NRAMP1, constitui uma forte indicação de que ela confere resistência aos ratinhos por impedir à micobactéria o acesso ao ferro. Desta forma, o crescimento inicial do *M. avium* é limitado, o que poderá por si só representar uma vantagem para a sua posterior eliminação. Por outro lado, a actividade da proteína NRAMP1 poderá ser articulada com mecanismos desencadeados mais tarde pelas células T para a eficaz eliminação da bactéria.

Que a restrição do acesso ao ferro pode limitar o crescimento do *M. avium* na fase inicial da infecção é evidente dos resultados apresentados no capítulo VII. Quando ratinhos de uma estirpe susceptível foram alimentados com uma dieta pobre em ferro, o crescimento do *M. avium* no fígado, baço e pulmão foi

significativamente inferior ao verificado em animais alimentados com dieta normal. Também a adição de alguns quelantes de ferro, nomeadamente DFO e HBED, provocou uma diminuição do crescimento do *M. avium* em macrófagos isolados. Contudo, a administração dos mesmos quelantes a animais infectados in vivo não teve efeito considerável sobre o crescimento da bactéria. Esta falta de efeito poderá estar relacionada com a falta de biodisponibilidade destes compostos no ratinho (Steward et al, 1996). Os resultados obtidos parecem-nos contudo suficientes para afirmar que o crescimento do *M. avium* pode ser controlado pela limitação do acesso da bactéria ao ferro. O hospedeiro desenvolve aliás mecanismos neste sentido, como é evidente na "anemia da doença crónica". Os nossos resultados confirmam aquilo que alguns clínicos já puderam constatar na prática: que é contraproducente contrariar a anemia que acompanha a tuberculose. Pelo contrário, poderá ser benéfica a administração de terapia de quelação do ferro, nomeadamente nos doentes com SIDA, que têm tendência a acumular ferro nos tecidos (Boelaert et al, 1996). Resultados positivos desta abordagem foram já obtidos na infecção pelo protozoário *Plasmodium falciparum* (Gordeuk et al, 1992). Há no entanto ainda um grande caminho a fazer na melhoria dos quelantes disponíveis, nomeadamente em termos de biodisponibilidade e diminuição da toxicidade. Os quelantes desenvolvidos até hoje foram-no a pensar no tratamento da sobrecarga de ferro por múltiplas transfusões, que está associada à acumulação de ferro em células parenquimatosas. Há que desenvolver moléculas, ou formas de dispensá-las (nomeadamente lipossomas) que favoreçam a absorção pelos macrófagos.

Embora os resultados apresentados no capítulo VIII sugiram fortemente que a função da proteína NRAMP1 é a de transportar ferro para fora do fagossoma que contém o *M. avium*, não existem provas

directas de que assim é. Também falta esclarecer como é que esta função está relacionada com as múltiplas diferenças observadas entre macrófagos que expressam o alelo G169 e o D169. Como exemplo, foi recentemente descrito que os fagossomas contendo *M. bovis* BCG em macrófagos resistentes têm pH mais baixo do que os presentes em macrófagos susceptíveis (Hackam et al, 1998). O estudo da biologia celular do macrófago, em particular nos mecanismos relacionados com a função do NRAMP1, permitirão num futuro próximo esclarecer estas questões.

Alguns estudos têm sido feitos no sentido de verificar se na população humana haverá expressão de alelos diferentes do gene *Nramp1*, que confirmam resistência ou susceptibilidade a infecções intracelulares e nomeadamente por micobactérias. Foram encontrados no gene *Nramp1* humano alguns polimorfismos. Num estudo realizado em doentes com tuberculose, foi encontrada maior frequência de alguns desses polimorfismos nos indivíduos infectados, quando comparados com controlos não infectados (Bellamy et al, 1998). Também num estudo realizado em doentes com lepra foi encontrada correlação entre a doença e a presença de determinados alelos do gene *Nramp1* (Abel et al, 1998). Já em estudos efectuados em mulheres de idade avançada, sem factores de predisposição conhecidos e infectadas com *M. avium* e em crianças com susceptibilidade aumentada a infecções por micobactérias, não foi encontrada qualquer correlação entre os polimorfismos e susceptibilidade (Huang et al, 1998, Newport et al, 1995). Em geral, o estudo do gene *Nramp1* no Homem não revelou qualquer mutação que pudesse justificar uma perda de funcionalidade da proteína e tudo indica que a população humana é, tanto quanto ao gene *Nramp1* diz respeito, toda ela "naturalmente resistente".

O *M. avium* é uma espécie de micobactéria geralmente não patogénica para a espécie humana. A capacidade dos indivíduos normais resistirem a esta infecção resulta provavelmente da expressão nos seus macrófagos de uma proteína NRAMP1 funcional, que restringe o acesso da bactéria ao ferro e do desenvolvimento de uma resposta T capaz de activar os macrófagos para aumentar a sua capacidade antimicrobiana. Os resultados apresentados neste trabalho permitem sugerir que o tratamento dos indivíduos que não conseguem montar este tipo de resposta e portanto desenvolvem uma infecção por *M. avium*, deverá incluir agentes que diminuam a quantidade de ferro presente nos tecidos e em particular no interior dos macrófagos e ainda inibidores da produção de monóxido de azoto, que aumentem a sobrevivência e recrutamento de células T para os locais de infecção. Os mecanismos pelos quais os macrófagos activados eliminam o *M. avium* continuam em grande parte por esclarecer. A resistência demonstrada pela bactéria à maior parte dos mecanismos antimicrobianos conhecidos dos macrófagos indica que haverá outros mecanismos por descobrir, envolvendo provavelmente o contacto directo entre os macrófagos infectados e as células T.

Referências

- Abel, L., F.O. Sanchez, J. Oberti, N.V. Thuc, L.V. Hoa, V.D. Lap, E. Skamene, P.H. Lagrange & E. Schurr. 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *Journal of Infectious Diseases*. 177: 133-145.
- Aderem, A.A., S.D. Wright, S.C. Silverstein & Z.A. Cohn. 1985. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 161: 617-622.
- Al-Ramadi, B.K., J.J. Meissler, D. Huang & T.K. Eisenstein. 1992. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *European Journal of Immunology* 22: 2249-2254.
- Albina, J.E., J.A. Abate & W.L. Henry. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN γ in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *Journal of Immunology* 147: 144-148.
- Alford, C.E., T.E. King Jr & P.A. Campbell. 1991. Role of transferrin, transferrin receptors and iron in macrophage listericidal activity. *The Journal of Experimental Medicine*. 174: 459-466.
- Allen, L.-A.H. & A. Aderem 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 184: 627-637.
- Allen, L.-A.H. & A. Aderem 1996. Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology*. 8: 36-40.
- Appelberg, R. & A.M. Sarmiento 1990. The role of macrophage activation and of Bcg-encoded function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 80: 324-331.
- Appelberg, R. & J. Pedrosa. 1992. Induction and expression of protective T cells during *Mycobacterium avium* infections in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 87: 379-385.
- Appelberg, R. & 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.G. Castro, J. Pedrosa, R.A. Silva, I.M. Orme & P. Minóprio. 1994. Role of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infection & Immunity*. 62: 3962-3971.

- Appelberg, R., A.G. Castro, J. Pedrosa & P. Minóprio.** 1994b. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology*. 82: 361-364.
- Appelberg, R., A.G. Castro, S. Gomes, J. Pedrosa & M.T. Silva.** 1995. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infection & Immunity*. 63: 3381-3387.
- Armstrong, J.A. & P. D'Arcy Hart.** 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *The Journal of Experimental Medicine*. 142: 1-16.
- Ashany, D., X. Song, E. Lacy, J. Nikolic-Zugic, S.M. Friedman & K.B. Elkon.** 1995. Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92: 11225-11229.
- Atkinson, P.G.P., J.M. Blackwell & C.H. Barton.** 1997. *Nramp1* locus encodes a 65 kDa interferon- γ -inducible protein in murine macrophages. *Biochemistry Journal*. 325: 779-786.
- Atkinson, P.G.P. & C.H. Barton.** 1998. Ectopic expression of *Nramp1* in COS-1 cells modulates iron accumulation. *FEBS Letters*. 425: 239-242.
- Banks, J., & I.A. Campbell.** 1998. Environment Mycobacteria. In *Clinical Tuberculosis*. P. D. O. Davies. Chapman & Hall Medical, London, U.K. 521-533.
- Barclay, R. & C. Ratledge** 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *Journal of Bacteriology*. 153: 1138-1146.
- Beatty, W.L., T.A. Belanger, A.A. Desai, R.P. Morrison & G.I. Byrne.** 1994. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infection & Immunity*. 62: 3705-3711.
- Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall & B.A. Freeman.** 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 87: 1620-1624.
- Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. Mcadam, H.C. Whittle & A. Hill.** 1998. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in west africans. *New England Journal of Medicine* 338: 640-644.
- Benson, C.A. & J.J. Ellner.** 1993. *Mycobacterium avium* Complex infection and AIDS: advances in theory and practice. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 7-20.
- Benson, C.A.** 1994. Disease due to the *Mycobacterium avium* Complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 18: S218-S222.

- Bermudez, L.E.M. & L. S. Young.** 1989. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. *Microbial Pathogenesis* 7: 289-298.
- Bermudez, L.E., L.S. Young & H. Enkel.** 1991. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infection & Immunity*. 59: 1697-1702.
- Berón, W., C. Alvarez-Dominguez, L. Mayorga & P.D. Stahl.** 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends in Cell Biology*. 5: 100-104.
- Besra, G.S. & D Chatterjee** 1994. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. B. R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC. 285-306.
- Bodaghi, B., O. Goureau, D. Zipeto, L. Laurent, J-L. Virelizier & S. Michelson.** 1999. Role of IFN γ -induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Immunology*. 162: 957-964.
- Boelaert, J.R., G.A Weinberg & E.D. Weinberg.** 1996. Altered iron metabolism in HIV infection: mechanisms, possible consequences and proposals for management. *Infectious Agents and Disease*. 5: 36-46.
- Bonecini-Almeida, M.G., S. Chitale, I. Boutsikakis, J. Geng, H. Doo, S. He & J.L. Ho.** 1998. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- γ and primed lymphocytes. *Journal of Immunology*. 160: 4490-4499.
- Bouton, C., L. Oliveira & J-C. Drapier.** 1998. Converse modulation of IRP1 and IRP2 by immunological stimuli in murine RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 9403-9408.
- Brennan, P.J. & P. Draper.** 1994. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. B. R. Bloom, B. R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC. 271-284.
- Byrd, T. & M.A. Horwitz.** 1989. Interferon gamma- activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *Journal of Clinical Investigation*. 83: 1457-1465.
- Carón, E. & A. Hall.** 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different rho GTPases. *Science*. 282: 1717-1721.
- Castro, A.G., R.A. Silva & R. Appelberg.** 1995. Endogenously produced IL-12 is required for the induction of protective T cells during *Mycobacterium avium* infections in mice. *Journal of Immunology*. 155: 2013-2019.

- Castro, A.G., P. Minóprio & R. Appelberg.** 1995b. The relative impact of bacterial virulence and host genetic background on cytokine expression during *Mycobacterium avium* infection of mice. *Immunology*. 85: 556-561.
- Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S.J. Turco, J-C Sibille, M. Snapper, P. Aisen & B.R. Bloom.** 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 86: 2453-2457.
- Chan, J., Y. Xing, R.S. Magiozzo & B.R. Bloom.** 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 175: 1111-1122.
- Chan, J., K. Tanaka, D. Carroll, J. Flynn & B.R. Bloom.** 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection & Immunity*. 63: 736-740.
- Chan, E.D., B.W. Winston, S-T. Uh, M.W. Wynes, D. M. Rose & D.W.H. Riches.** 1999. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN γ and TNF α in mouse macrophages. *Journal of Immunology* 162: 415-422.
- Chatterjee, D., A.D. Roberts, K. Lowell, P.J. Brennan & I.M. Orme.** 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of Tumor Necrosis Factor. *Infection & Immunity*. 60: 1249-1253.
- Chin, D.P., A.L. Reingold, E.N. Stone, E. Vittinghoff, C.R. Horsburgh Jr, K. Hadley, S.M. Ostroff & P.C. Hopewell.** 1994. The impact of *Mycobacterium avium* complex bacteremia and its treatment on survival of AIDS patients- a prospective study. *Journal of Infectious Diseases*. 170: 578-584.
- Clemens, D.L. & M.A. Horwitz.** 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *The Journal of Experimental Medicine*. 181: 257-270.
- Clemens, D.L. & M.A. Horwitz** 1996. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *The Journal of Experimental Medicine*. 184: 1349-1355.
- Crowle, A.J., D.L. Cohn & P. Poche.** 1989. Defects in sera from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and from non-AIDS patients with *Mycobacterium avium* infection which decrease macrophage resistance to *M. avium*. *Infection & Immunity*. 57: 1445-1451.
- Crowle, A.J., R. Dahl, E. Ross & M.H. May.** 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infection & Immunity*. 59: 1823-1831.
- Crowle, A.J., E.R. Ross, D.L. Cohn, J. Gilden & M.H. May.** 1992. Comparison of the abilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*

to infect and multiply in cultured human macrophages from normal and human deficiency virus-infected subjects. *Infection & Immunity*. 60: 3697-3703.

Cywes, C., N.L. Godenir, H.C. Hoppe, R.R. Scholle, L.M. Steyn, R.E. Kirsch & M.R.W. Ehlers. 1996. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese Hamster Ovary cells. *Infection & Immunity*. 64: 5373-5383.

Daniel, T.M., J.H. Bates & K.A Downes. 1994. History of tuberculosis. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. B. R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC.

de Chastellier, C., C. Frehel, C. Offredo & E. Skamene. 1993. Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. *Infection & Immunity*. 61: 3775-3784.

de Chastellier, C., M. Thibon & M. Rabinovitch. Efficient fusion of *Mycobacterium avium* vacuoles with those that shelter the Rickettsia *Coxiella burnetii* in doubly infected mouse macrophages. 35th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington, DC. 1995.

de Groote, M.A. & F.C. Fang. 1995. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clinical Infectious Diseases*. 21: S162-S165.

de Maria, R., M. G. Cifone, R. Trotta, M.R. Rippo, C. Festuccia, A. Santoni & R. Testi. 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. 180: 1999-2004.

Denham, S. & I.J. Rowland. 1992. Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophages: the role of nitric oxide. *Clinical and Experimental Immunology*. 87: 157-162.

Denis, M. & E. Ghadirian. 1994. *Mycobacterium avium* infection in HIV-1-infected subjects increases monokine secretion and is associated with enhanced viral load and diminished immune response to viral antigens. *Clinical and Experimental Immunology*. 97: 76-82.

Denis, M. 1994. Human monocytes/ macrophages: NO or no NO? *Journal of Leukocyte Biology* 55: 682-684.

Desjardins, M., L.A. Huber, R.G. Parton & G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of Cell Biology*. 124: 677-688.

Desjardins, M., J.E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths & L.A. Huber. 1994. Molecular characterization of phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 51: 32194-32200.

- Desjardins, M.** 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends in Cell Biology*. 5: 183-186.
- Dhople, A.M., M.A. Ibanez & T.C. Poirier.** 1996. Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios*. 87: 77-87.
- Dimier, L.H. & D.T. Bout** 1998. Interferon- γ -activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology*. 94: 488-495.
- Ding, A.H., C.F. Nathan & D.J. Stuehr.** 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 141: 2407-2412.
- Djeha, A., J.L. Pérez-Arellano, S.L. Hayes & J.H. Brock.** 1992. Transferrin synthesis by macrophages: up-regulation by γ -interferon and effect on lymphocyte proliferation. *FEMS Microbiology Immunology*. 105: 279-282.
- Doi, T., M. Ando, T. Akaike, M. Suga, K. Sato & H. Maeda.** 1993. Resistance to Nitric Oxide in *Mycobacterium avium* Complex and its Implication in Pathogenesis. *Infection & Immunity*. 61: 1980-1989.
- Douvas, G.S., M.H. May, E. Ross & A.J. Crowle.** 1992. Characterization of inhibition of *Mycobacterium avium* replication in macrophages by normal human serum. *Infection & Immunity*. 60: 345-352.
- Douvas, G.S., M.H. May & A.J. Crowle.** 1993. Transferrin, iron and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *Journal of Infectious Diseases* 167: 857-864.
- Drapier, J.-C. & J. B. Hibbs.** 1988. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *Journal of Immunology* 140: 2829-2838.
- Drapier, J.-C., H. Hirling, J. Wietzerbin, P. Kaldy & L.C. Kühn.** 1993. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *The EMBO Journal*. 12: 3643-3649.
- Dunne, D.W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger & K. A. Joiner.** 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 91: 1863-1867.
- Ernst, J.D.** 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection & Immunity*. 66: 1277-1281.
- Evans, C.C.** 1998. Clinical Tuberculosis- historical background. *In Clinical tuberculosis*. P. D. O. Davies. Chapman & Hall, London, U.K. 1-19.
- Ezekowitz, R.A.B., K. Sastry, P. Bailly & A. Warner.** 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple

carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 172: 1785-1794.

Falkinham III, J.O. 1996. Epidemiology of infections by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 9: 177-215.

Fang, F.C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation*. 99: 2818-2825.

Fleming, M.D., C.C. Trenor III, M.A. Su, D. Foernzler, D.R. Beier, W.F. Dietrich & N.C. Andrews. 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*. 16: 383-386.

Fleming, M.D., M.A. Romano, M.A. Su, L.M. Garrick, M.D. Garrick & N.C. Andrews. 1998. *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 95: 1148-1153.

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

Flórido, M., R. Appelberg, I.M. Orme & A.M. Cooper. 1997. Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. *Immunology*. 90: 600-606.

Flórido, M., A.S. Gonçalves, R.A. Silva, S. Ehlers & R. Appelberg. 1999. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to interferon- γ -mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of mycobacteriostasis. *Infection & Immunity*.

Forman, H.J. & M.J. Thomas. 1986. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annual Reviews in Physiology*. 48: 669-680.

Formica, S., T.I.A. Roach & J.M. Blackwell. 1994. Interaction with extracellular matrix proteins influences *Lsh/Ity/Bcg* (candidate *Nramp*) gene regulation of macrophage priming/ activation for tumour necrosis factor- α and nitrite release. *Immunology*. 82: 42-50.

Frehel, C., C. de Chastellier, T. Lang & N. Rastogi. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and pre-lysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infection & Immunity*. 52: 252-262.

Frehel, C., C. de Chastellier, C. Offredo & P. Berche. 1991. Intramacrophage growth of *Mycobacterium avium* during infection of mice. *Infection & Immunity*. 59: 2207-2214.

Furney, S.K., P.S. Skinner, A.D. Roberts, R. Appelberg & 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. *Infection & Immunity*. 60: 4410-4413.

Gangadharam, P.R.J. & P.F. Pratt. 1984. Susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to hydrogen peroxide. *American Reviews in Respiratory Diseases*. 130: 309-311.

Gangadharam, P.R.J. & C.K. Edwards III. 1984. Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. *American Reviews in Respiratory Diseases*. 130: 834-838.

Gebzan, S.J., Y. Yamamoto, C. Newton, T.W. Klein & H. Friedman. 1994. Inhibition of *Legionella pneumophila* growth by gamma interferon in permissive A/J mouse macrophages: role of reactive oxygen species, nitric oxide, tryptophan and iron (III). *Infection & Immunity*. 62: 3197-3205.

Gebzan, S.J., C. Newton, Y. Yamamoto, R. Widen, T.W. Klein & H. Friedman. 1994. Macrophage permissiveness for *Legionella pneumophila* growth modulated by iron. *Infection & Immunity*. 62: 564-568.

Ghassemi, M., B.R. Andersen, V.M. Reddy, P.R.J. Gangadharam, G.T. Spear & R.M. Novak. 1995. Human Immunodeficiency Virus and *Mycobacterium avium* complex coinfection of monocytoid cells results in reciprocal enhancement of multiplication. *Journal of Infectious Diseases* 171: 68-73.

Giri, D.K., R.T. Mehta, R.G. Kansal & B.B. Aggarwal. 1998. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex activates nuclear transcription factor- κ B in different cell types through reactive oxygen intermediates. *Journal of Immunology* 161: 4834-4841.

Gobin, J. & M.A. Horwitz. 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *The Journal of Experimental Medicine* 183: 1527-1532.

Gordeuk, V.R., P. Thuma, G. Brittenham et al. 1992. Effects of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *New England Journal Medicine* 327: 1473-1477.

Govoni, G., S. Gauthier, F. Billia, N.N. Iscove & P. Gros. 1997. Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 62: 277-286.

Grange, J.M. 1998. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. In *Clinical Tuberculosis*. P. D. O. Davies. Chapman & Hall Medical, London, U.K. 129-152.

Green, L.C., S.R. Tannenbaum & P.G. Goldman. 1981. Nitrate synthesis in the germ-free and conventional rat. *Science*. 212: 56-58.

Greenberg, S. & S.C. Silverstein. 1993. Phagocytosis. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul. Raven Press, New York. 941-962.

- Greenberg, S.** 1995. Signal transduction of phagocytosis. *Trends in Cell Biology*. 5: 93-99.
- Gregory, S.H., E.J. Wing, R.A. Hoffman & R.L. Simmons.** 1993. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *Journal of Immunology* 150: 2901-2909.
- Grinstein, S., A. Nanda, G. Lukacs & O. Rotstein.** 1992. V-ATPases in phagocytic cells. *The Journal of Experimental Biology*. 172: 179-192.
- Gruenheid, G., E. Pinner, M. Desjardins, & P. Gros.** 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of Experimental Medicine* 185: 717-730.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, U.V. Berger, Y. Gunshin, M.F. Romero, W.F. Boron, S. Nussberger, J.L. Gollan & M.A. Hedlger.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 388: 482-488.
- Gupta, S.L., J.M. Carlin, P. Pyati, W. Dai, E.R. Pfefferkorn & M.J. Murphy Jr.** 1994. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infection & Immunity*. 62: 2277-2284.
- Hackam, D.J., O.D. Rotstein, W-J. Zhang, S. Gruenheid, P. Gros & S. Grinstein.** 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) impairs phagosomal acidification. *The Journal of Experimental Medicine*. 188: 351-364.
- Haidaris, C.G. & P.F. Bonventre.** 1982. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *Journal of Immunology* 129: 850-855.
- Harshan, K.V. & P.R.J. Gangadharam.** 1991. In vivo depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of *Mycobacterium avium* complex in mice. *Infection & Immunity*. 59: 2818-2821.
- Haug, C.J., P. Aukrust, E. Lien, F. Müller, T. Espevik & S.S. Frøland.** 1996. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS: immunopathogenic significance of an activated Tumor Necrosis Factor system and depressed serum levels of 1,25 dihydroxyvitamin D. *Journal of Infectious Diseases*. 173: 259-262.
- Haworth, R., N. Platt, S. Keshav, D. Hughes, E. Darley, H. Susuki, Y. Kurihara, T. Kodama & S. Gordon.** 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 1431-1439.
- Hayashi, T., S.P. Rao & A. Catanzaro.** 1997. Binding of the 68-kilodalton protein of *Mycobacterium avium* to $\alpha\gamma\beta_3$ on human monocyte-derived macrophages

enhances complement receptor type 3 expression. *Infection & Immunity*. 65: 1211-1216.

Hänsch, H.C.R., D.A. Smith, M.E.A. Mielke, H. Hahn, G.J. Bancroft & S. Ehlers. 1996. Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4⁺ T cells. *International Immunology* 8: 1299-1310.

Hentze, M.W. & L.C. Kühn. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 93: 8175-8182.

Hibbs, J.B., R.R. Taintor & Z. Vavrin. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 235: 473-476.

Hogaboam, C.M., S.W. Chensue, M. L. Steinhauser, G.B. Huffnagle, N.W. Lukacs, R.M. Strieter & S.L. Kunkel. 1997. Alteration of the cytokine phenotype in an experimental lung granuloma model by inhibiting nitric oxide. *Journal of Immunology* 159: 5585-5593.

Holland, S.M., E.M. Eisenstein, D.B. Kuhns, M.L. Turner, T.A. Fleisher, W. Strober & J.I. Gallin. 1994. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with Interferon gamma. *New England Journal of Medicine* 330: 1348-1355.

Holland, S.M. 1996. Host defense against nontuberculous mycobacterial infections. *Seminars in Respiratory Infections*. 11: 217-230.

Hopewell, P.C. 1994. Overview of Clinical Tuberculosis. In *Tuberculosis: Pathology, Protection and Control*. B. R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC. 25-46.

Huang, F.-P., W. Niedbala, X-Q. Wei, D. Xu, G-J. Feng, J.H. Robinson, C. Lam & F.Y. Liew. 1998. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *European Journal of Immunology* 28: 4062-4070.

Inderlied, C.B., C.A. Kemper & L.E.M. Bermudez. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*. 6: 266-310.

Jackson, S.H., J.I. Gallin & S. M. Holland. 1995. The p47^{phox} mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 182: 751-758.

Johnson, J.L., H. Shiratsuchi, H. Toba & J.J. Hellner. 1991. Preservation of monocyte effector functions against *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare* in patients with AIDS. *Infection & Immunity*. 59: 3639-3645.

Jones, J.L., D.L. Hanson, M.S. Dworkin, J.E. Kaplan & J.W. Ward. 1998. Trends in AIDS-related opportunistic infections among men who have sex with

men and among injecting drug users, 1991-1996. *Journal of Infectious Diseases*. 178: 114-120.

Karupiah, G., J-H. Chen, S. Mahalingam, C.F. Nathan & J.D. MacMicking. 1998. Rapid interferon γ dependent clearance of Influenza A Virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2- deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 188: 1541-1546.

Källenius, G., T. Koivula, K.J. Rydgård, S.E. Hoffner, A. Valentin, B. Åsjö, C. Ljungh, U. Sharma & S.B. Svenson. 1992. Human Immunodeficiency Virus type1 enhances intracellular growth of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Infection & Immunity*. 60: 2453-2458.

Klebanoff, S.J. 1992. Oxygen Metabolites from phagocytes. *In Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Gallin, Goldstein & Snyderman. Raven Press, New York. 541-588.

Koblish, H.K., C.A. Hunter, M. Wysocka, G. Trinchieri & W.M.F. Lee. 1998. Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon γ induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *The Journal of Experimental Medicine*. 188: 1603-1610.

Kobzik, L., J.J. Godleski & J.D. Brain. 1990. Selective down-regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis. *Journal of Immunology* 144: 4312-4319.

Kobzik, L. 1995. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates- role of scavenger-type receptors. *Journal of Immunology* 155: 367-376.

Krieger, M., S. Acton, J. Ashkenas, A. Pearson, M. Penman & D. Resnick. 1993. Molecular flypaper, host defense and atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 4569-4572.

Kröncke, K.D., K. Fehsel & V. Kolb-Bachofen. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 113: 147-156.

Lambrecht, R.S. & A.K. Mjanger. 1993. Iron availability alters extracellular and intracellular replication of *Mycobacterium avium*. *Abstracts of the Annual Meeting of American Society for Microbiology, Washington DC, abstr nr U-70*.

Lane, T.E., B.A. Wu-Hsieh & D.H. Howard. 1991. Iron limitation and the gamma interferon-mediated anti-histoplasma state of murine macrophages. *Infection & Immunity*. 59: 2274-2278.

Laochumroonvorapong, P., S. Paul, K.B. Elkon & G. Kaplan. 1996. H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare* within cultured human monocytes. *Infection & Immunity*. 64: 452-459.

Lecoanet-Henchoz, S., J-F. Gauchat, J-P. Aubry, P. Graber, P. Life, N. Paul-Eugene, B. Ferrua, A.L. Corbi, B. Dugas, C. Plater-Zyberk &

- J-Y. Bonnefoy.** 1995. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity*. 3: 119-125.
- MacMicking, J.D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D.S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q-W. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen, & J.S. Mudgett.** 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 81: 641-650.
- MacMicking, J.D., R.J. North, R. LaCourse, J.S. Mudgett, S.K. Shah and C.F. Nathan.** 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94: 5243-5248.
- Marletta, M.A., P.S. Yoon, R. Iyengar, C.D. Leaf & J. S. Wishnok.** 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*. 27: 8706-8711.
- Martin, E., C. Nathan & Q-W. Xie.** 1994. Role of Interferon Regulatory Factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine*. 180: 977-984.
- Mauël, J., A. Ransijn & Y. Buchmüller-Rouillier.** 1991. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *Journal of Leukocyte Biology* 49: 73-82.
- Mehta, S.J., R.D. Miller, J.A. Ramirez & J.T. Summersgill.** 1998. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in Hep-2 cells by Interferon- γ : role of tryptophan catabolism. *Journal of Infectious Diseases* 177: 1326-1331.
- Melillo, G., G.W. Cox, D. Radzioch & L. Varesio.** 1993. Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, is a co-stimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *Journal of Immunology* 150: 4031-4040.
- Melillo, G., T. Musso, A. Sica, L.S. Taylor, G.W. Cox & L. Varesio.** 1995. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *The Journal of Experimental Medicine*. 182: 1683-1693.
- Melillo, G., L.S. Taylor, A. Brooks, T. Musso, G.W. Cox & L. Varesio.** 1997. Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 12236-12243.
- Mevorach, D., J.O. Mascarenhas, D. Gershov & K. B. Elkon.** 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 188: 2313-2320.

- Meylan, P.R.A., J.R. Munis, D.D. Richman & R.S. Kornbluth.** 1992. Concurrent human immunodeficiency virus and mycobacterial infection of macrophages in vitro does not reveal any reciprocal effect. *Journal of Infectious Diseases* 165: 80-86.
- Molloy, A., P. Laochumronvorapong & G. Kaplan.** 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *The Journal of Experimental Medicine*. 180: 1499-1509.
- Murray, H.W. & Z.A. Cohn** 1980. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine* 152: 1596-1609.
- Murray, H.W., A. Szuro-Sudol, D. Wellner, M.J. Oca, A.M. Granger, D.M. Libby, C.D. Rothermel & B.Y. Rubin.** 1989. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infection & Immunity*. 57: 845-849.
- Murray, C.J.L. & J.A. Salomon.** 1998. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 95: 13881-13886.
- Nathan, C.F., H.W. Murray, M.E. Wiebe & B.Y. Rubin.** 1983. Identification of IFN γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine* 158: 670-689.
- Nathan, C.F. & J.B. Hibbs** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*. 3: 65-70.
- Nathan, C. & Q. Xie.** 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell*. 78: 915-918.
- Newman, G.W., T.G. Kelley, H. Gan, O. Kandil, M.J. Newman, P. Pinkston, R.M. Rose & H.G. Remold.** 1993. Concurrent infection of human macrophages with HIV-1 and *Mycobacterium avium* results in decreased cell viability, increased *M. avium* multiplication and altered cytokine production. *Journal of Immunology* 151: 2261-2272.
- Newport, M., M. Levin, J. Blackwell, M.A. Shaw, R. Williamson, & C. Huxley.** 1995. Evidence for exclusion of a mutation in NRAMP as the cause of familial disseminated atypical mycobacterial infection in a Maltese kindred. *Journal of Medical Genetics*. 32: 904-906.
- Nicholson, S., M.G. Bonecini-Almeida, J.R.L. Silva, C. Nathan, Q-W. Xie, R. Mumford, J.R. Weidner, J. Calaycay, J. Geng, N. Boechat, C. Linhares, W. Rom & J. L. Ho.** 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 183: 2293-2302.
- O'Brien, S., P.S. Jackett, D.B. Lowrie & P.W. Andrew.** 1991. Guinea-pig alveolar macrophages kill *Mycobacterium tuberculosis* in vitro, but killing is

independent of susceptibility to hydrogen peroxide or triggering of the respiratory burst. *Microbial Pathogenesis* 10: 199-207.

O'Brien, L., J. Carmichael, D.B. Lowrie & P.W. Andrew. 1994. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. *Infection & Immunity*. 62: 5187-5190.

Oddo, M., T. Renno, A. Attinger, T. Bakker, H.R. MacDonald & P.R.A. Meylan. 1998. Fas Ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 160: 5448-5454.

Oh, Y.-K. & R.M. Straubinger. 1996. Intracellular fate of *Mycobacterium avium*:: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infection & Immunity*. 64: 319-325.

Ohga, S., K. Ikeuchi, R. Kadoya, K. Okada, C. Miyazaki, S. Suita & K Ueda. 1997. Intrapulmonary *Mycobacterium avium* infection as the first manifestation of chronic granulomatous disease. *Journal of Infection*. 34: 147-150.

Orme, I.M., S.K. Furney & A.D. Roberts. 1992. Dissemination of enteric *Mycobacterium avium* infections in mice rendered immunodeficient by thymectomy and CD4 depletion or by prior infection with murine AIDS retroviruses. *Infection & Immunity*. 60: 4747-4753.

Ottenhoff, T.H.M., D. Kumararatne & J.-L. Casanova. 1998. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunology Today*. 19: 491.

Pais, T.F. & R. Appelberg Picolinic acid, a catabolite of L-Tryptophan, induces intra-macrophagic bacteriostasis in *Mycobacterium avium*. 13th European Immunology Meeting. Amsterdam, The Netherlands. 1997.

Palmer, R.M.J., D.S. Ashton & S. Moncada. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333: 664-666.

Pantopoulos, K. & M.W. Hentze. 1995. Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92: 1267-1271.

Pattyn, S.R., P. Dockx & J.A. Cap. 1981. La Lèpre- microbiologie, diagnostic, traitement et lutte. Masson. Paris.

Pedrosa, J., M. Flórido, Z.M. Kunze, A.G. Castro, F. Portaels, J. McFadden, M. T. Silva & R. Appelberg. 1994. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 98: 210-216.

- Pfefferkorn, E.R.** 1984. Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 82: 908-912.
- Pinner, E., S. Gruenheid, M. Raymond & P. Gros.** 1997. Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family *SMF* by *Nramp2*, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 28933-28938.
- Pitt, A., L.S. Mayorga, P.D. Stahl & A.L. Schwartz.** 1992. Alterations in protein composition of maturing phagosomes. *Journal of Clinical Investigation*. 90: 1978-1983.
- Poe, J.C., D.H. Wagner Jr, R.W. Miller, R.D. Stout & J. Suttles.** 1997. IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis. *Journal of Immunology* 159: 846-852.
- Polotsky, V.Y., J.T. Belisle, K. Mikusova, R.A.B. Ezekowitz & K. A. Joiner.** 1997. Interaction of human mannose-binding protein with *Mycobacterium avium*. *Journal of Infectious Diseases* 175: 1159-1168.
- Rabinovitch, M.** 1968. Phagocytosis: the engulfment stage. *Seminars in Hematology*. 5: 134-155.
- Rabinovitch, M. & P.S.T. Veras** 1996. Cohabitation of *Leishmania amazonensis* and *Coxiella burnetii*. *Trends in Microbiology*. 4: 168-171.
- Rao, S.P., K.R. Gehlsen & A. Catanzaro.** 1992. Identification of a β 1 integrin on *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare*. *Infection & Immunity*. 60: 3652-3657.
- Rao, S.P., K. Ogata & A. Catanzaro.** 1993. *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare* binds to the integrin receptor α v β 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection & Immunity*. 61: 663-670.
- Ratledge, C. & J. Stanford** 1982. Introduction. *In The biology of the mycobacteria*. C. Ratledge & J. Stanford. Academic Press, London. 1-6.
- Ratledge, C.** 1982. Nutrition, growth and metabolism. *In The biology of mycobacteria*. C. Ratledge & J. Stanford Academic Press, London. 185-271.
- Ratliff, T.L., R. McCarthy, W.B. Telle & E.J. Brown.** 1993. Purification of a mycobacterial adhesin for fibronectin. *Infection & Immunity*. 61: 1889-1894.
- Ravetch, J.V.** 1994. Fc receptors: rubor redux. *Cell*. 78: 553-560.
- Recalcati, S., D. Taramelli, D. Conte & G. Cairo.** 1998. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downmodulation. *Blood*. 91: 1059-1066.
- Reddy, V.M.** 1998. Mechanism of *Mycobacterium avium* Complex pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 3: d525-531.

- Rhoades, E.R. & I.M. Orme** 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infection & Immunity*. 65: 1189-1195.
- Roach, T.I.A., C.H. Barton, D. Chatterjee & J.M. Blackwell.** 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE and Tumor Necrosis Factor α . *Journal of Immunology* 150: 1886-1896.
- Roecklein, J.A., R.P. Swartz & H. Yeager Jr.** 1992. Nonopsonic uptake of *Mycobacterium avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 119: 772-781.
- Rotrosen, D.** 1992. The respiratory burst oxidase. *In* Inflammation: basic principles and clinical correlates. Gallin, Goldstein & Snyderman. Raven Press, New York. 589-601.
- Russell, D.G., J. Dant & S. Sturgill-Koszycki.** 1996. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*- containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *Journal of Immunology* 156: 4764-4773.
- Sambrano, G.R., S. Parthasarathy & D. Steinberg.** 1994. Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 91: 3265-3269.
- Sarmiento, A. & R. Appelberg** 1995. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of Tumor Necrosis Factor Alpha production in infected mice and in vitro- cultured mouse macrophages. *Infection & Immunity*. 63: 3759-3764.
- Sarmiento, A. & R. Appelberg** 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in Tumor Necrosis Factor Alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. *Infection & Immunity*. 64: 3224-3230.
- Sasada, M., & R.B. Johnston Jr.** 1980. Macrophage microbicidal activity- correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 152: 85-98.
- Sato, K., H. Tomioka & H. Saito** 1992. Differential susceptibilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to sodium nitrite. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2994-2995.
- Saunders, B.M. & C. Cheers** 1995. Inflammatory response following intranasal infection with *Mycobacterium avium* complex: role of T-cell subsets and gamma interferon. *Infection & Immunity*. 63: 2282-2287.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg & C. Haslett.** 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*. 343: 170-173.

- Savill, J., V. Fadok, P. Henson & C. Haslett.** 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today*. 14: 131-136.
- Schaible, U.E., S. Sturgill-Koszycki, P.H. Schlesinger & D.G. Russell.** 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *Journal of Immunology* 160: 1290-1296.
- Scharton-Kersten, T.M., G. Yap, J. Magram & A. Sher.** 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine* 185: 1261-1273.
- 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. *Journal of Immunology* 150: 2920-2930.
- Schlesinger, L.S., T.M. Kaufman, S. Iyer, S.R. Hull & L. K. Marchiando.** 1996. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *Journal of Immunology* 157: 4568-4575.
- Schoedon, G., M. Schneemann, R. Walter, N. Blau, S. Hofer & A. Schaffner.** 1995. Nitric oxide and infection: another view. *Clinical Infectious Diseases*. 21: S152-S157.
- Schorey, J.S., M.C. Carroll & E.J. Brown.** 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 277: 1091-1093.
- Schreiber, S., S.L. Perkins, S.L. Teitelbaum, J. Chappel, P.D. Stahl & J.S. Blum.** 1993. Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN γ . *Journal of Immunology* 151: 4973-4981.
- Schurr, E., D. Malo, D. Radzioch, E. Buschman, K. Morgan, P. Gros & E. Skamene.** 1991. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. *Immunology Today*. A42-A45.
- Searle, S., N.A. Bright, T.I.A. Roach, P.G.P. Atkinson, C.H. Barton, R.H. Melen & J.M. Blackwell.** 1998. Localization of NRAMP1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science*. 111: 2855-2866.
- Sherman, D.R., P.J. Sabo, M.J. Hickey, T.M. Arain, G.G. Mahairas, Y. Yuan, C.E. Barry & C.K. Stover.** 1995. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92: 6625-6629.

- Shibata, Y., W.J. Metzger & Q.N. Myrvik.** 1997. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan. *Journal of Immunology* 159: 2462-2467.
- Shiratsuchi, H., J.L. Johnson, Z. Toossi & J.J. Ellner.** 1994. Modulation of the effector function of human monocytes for *Mycobacterium avium* by Human Immunodeficiency Virus-1 envelope glycoprotein gp120. *Journal of Clinical Investigation*. 93: 885-891.
- Sibley, L.D., S.G. Franzblau & J.L. Krahenbuhl.** 1987. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infection & Immunity*. 55: 680-685.
- Silva, M.T., M.N.T. Silva & R. Appelberg.** 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microbial Pathogenesis* 6: 369-380.
- Silver, R.F., Q. Li, W.H. Boom & J.J. Ellner.** 1998. Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4⁺ T cells in purified protein derivative- positive, but not in purified protein derivative- negative subjects. *Journal of Immunology* 160: 2408-2417.
- Smith, P.G. & A.R. Moss** 1994. Epidemiology of tuberculosis. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. B. R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington. 47-58.
- Smith, D., H. Häscher, G. Bancroft & S. Ehlers.** 1997. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor- α and interferon- γ . *Immunology*. 92: 413-421.
- Snider Jr, D.E., M. Raviglione & A. Kochi.** 1994. Global burden of tuberculosis. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. B.R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC. 3-10.
- Sommers, H.M. & R.C. Good** 1985. *Mycobacterium*. In *Manual of Clinical Microbiology*. E. H. Lennette. American Society for Microbiology, Washington, DC. 216-248.
- Stahl, P.D. & R.A.B. Ezekowitz** 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*. 10: 50-55.
- Stein, M. & S. Gordon** 1991. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *European Journal of Immunology* 21: 431-437.
- Stenger, S., R.J. Mazzaccaro, K. Uyemura, S. Cho, P.F. Barnes, J-P. Rosat, A. Sette, M.B. Brenner, S.A. Porcelli, B.R. Bloom & R.L.**

- Modlin.** 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. 276: 1684-1687.
- Steward, A., I. Williamson, T. Madigan, A. Bretnall & I.F. Hassan.** 1996. An improved animal model for studying desferrioxamine. *British Journal of Haematology*. 95: 654-659.
- Stewart-Tull, D.E.S.** 1982. *Mycobacterium leprae*- the bacteriologist's enigma. In The biology of the mycobacteria. C. Ratledge & J. Stanford. Academic Press, London. 273-307.
- Stokes, R.W., I.M. Orme, & F.M. Collins.** 1986. Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. *Infection & Immunity*. 54: 811-819.
- Stokes, R.W., L.M. Thorson & D.P. Speert.** 1998. Nonopsonic and opsonic association of *Mycobacterium tuberculosis* with resident alveolar macrophages is inefficient. *Journal of Immunology* 160: 5514-5521.
- Stout, R.D., J. Suttles, J. Xu, I.S. Grewal & R.A. Flavell.** 1996. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 Ligand-deficient mice. *Journal of Immunology* 156: 8-11.
- Stuehr, D.J. & M.A. Marletta** 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 82: 7738-7742.
- Stuehr, D.J. & M.A. Marletta** 1987. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or Interferon- γ . *Journal of Immunology* 139: 518-525.
- Sturgill-Koszycki, S., P.H.Schlesinger, P.Chakraborty, P.L.Haddix, H.L.Collins, A.K.Fok, R.D.Allen, S.L.Gluck, J.Heuser, and D.G.Russell.** 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 263: 678-681.
- Suttles, J., M. Evans, R.W. Miller, J.C. Poe, R.D. Stout & L.M. Wahl.** 1996. T cell rescue of monocytes from apoptosis: role of the CD40-CD40L interaction and requirement for CD40-mediated induction of protein tyrosine kinase activity. *Journal of Leukocyte Biology* 60: 651-657.
- Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka et al.** 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 386: 292-296.
- Swartz, R.P., D. Naai, C.-W. Vogel & H. Yeager Jr.** 1988. Differences in uptake of mycobacteria by human monocytes: a role for complement. *Infection & Immunity*. 56: 2223-2227.

- Sypek, J.P. & D.J. Wyler** 1991. Antileishmanial defense in macrophages triggered by tumor necrosis factor expressed on CD4⁺ T-lymphocyte plasma membrane. *The Journal of Experimental Medicine*. 174: 755-759.
- Sypek, J.P., S. Jacobson, A. Vorys & D.J. Wyler**. 1993. Comparison of gamma interferon, tumor necrosis factor, and direct cell contact in activation of antimycobacterial defense in murine macrophages. *Infection & Immunity*. 61: 3901-3906.
- Takikawa, O., T. Kuroiwa, F., Yamazaki & R. Kido**. 1988. Mechanism of Interferon- γ action: Characterization of indoleamine-2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon- γ and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 263: 2041-2048.
- Tarrant, T.K., P.B. Silver, J.L. Wahlsten, L.V. Rizzo, C. Chan, B. Wiggert & R.R. Caspi**. 1999. Interleukin 12 protects from a T helper type 1-mediated autoimmune disease, experimental uveitis, through a mechanism involving interferon γ , nitric oxide and apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 189: 219-230.
- Taylor, M.E. & K. Drickamer** 1993. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 399-404.
- Taylor-Robinson, A.W., F.Y. Liew, A. Severn, D. Xu, S.J. McSorley, P. Garside, J. Padron & R.S. Philips**. 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *European Journal of Immunology* 24: 980-984.
- Thomas, S.M., L.F. Garrity, C.R. Brandt, C.S. Shobert, G-S. Feng, M.W. Taylor, J.M. Carlin & G.I. Byrne**. 1993. IFN- γ -mediated antimicrobial response: indoleamine-2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia spp* or *Toxoplasma* growth. *Journal of Immunology* 150: 5529-5534.
- Thornton, B.P., V. Vetvicka, M. Pitman, R.C. Goldman & G.D. Ross**. 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology* 156: 1235-1246.
- Toba, H., J.T. Crawford & J.J. Ellner**. 1989. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma interferon. *Infection & Immunity*. 57: 239-244.
- Torriani, F.J., J.A. McCutchan, S.A. Bozzette, M.R. Grafe & D.V. Havlir**. 1994. Autopsy findings in patients with *Mycobacterium avium* complex bacteremia. *Journal of Infectious Diseases* 170: 1601-1605.

- Torriani, F.J., C.A. Behling, J.A. McCutchan, R.H. Haubrich & D.V. Havlir.** 1996. Disseminated *Mycobacterium avium* complex: correlation between blood and tissue burden. *Journal of Infectious Diseases* 173: 942-949.
- Trias, J., V. Jarlier & R. Benz.** 1992. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science*. 258: 1479-1481.
- Trias, J. & R. Benz** 1993. Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 6234-6240.
- van de Winkel, J.G.J. & P.J.A. Capel** 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today*. 14: 215-221.
- van der Laan, L.J.W., E.A. Döpp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C.D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason & G. Kraal.** 1999. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *Journal of Immunology* 162: 939-947.
- Varesio, L., M. Clayton, E. Blasi, R. Ruffman & D. Radzioch.** 1990. Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, as a second signal in the activation of the IFN γ -primed macrophages. *Journal of Immunology* 145: 4265-4271.
- Veras, P.S.T., C. de Chastellier, M-F. Moreau, V. Villiers, M. Thibon, D. Mattei & M. Rabinovitch.** 1994. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Cell Science*. 107: 3065-3076.
- Veras, P.S.T., C. Moulia, C. Dauguet, C.T. Tunis, M. Thibon & M. Rabinovitch.** 1995. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. *Infection & immunity*. 63: 3502-3506.
- Vidal, S.M., D; Vogan, K; Skamene, E and Gros, P.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*. 73: 469-485.
- Vidal, S., M.L. Tremblay, G. Govoni, S. Gauthier, G. Sebastiani, D. Malo, E. Skamene, M. Olivier, S. Jothy & P. Gros.** 1995. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *The Journal of Experimental Medicine*. 182: 655-666.
- Vidal, S.P., E; Lepage, P; Gauthier, S and Gros, P.** 1996. Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp*^{D169}) mouse strains. *Journal of Immunology* 157: 3559-3568.

- Wahl, S.M., T. Greenwell-Wild, G. Peng, H. Hale-Donze, T.M. Doherty, D. Mizel & J.M. Orenstein.** 1998. *Mycobacterium avium* complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 95: 12574-12579.
- Wakelin, J. & J.M. Blackwell.** 1993. Genetic variations in immunity to parasitic infections. *In Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections.* K. Warren. Blackwell Scientific Publications, New York. 3-22.
- Walker, L. & D.B. Lowrie** 1981. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. *Nature.* 293: 69-70.
- Webb, D.S.A., Y. Shimizu, G.A. van Seventer, S. Shaw & T.L. Gerrard.** 1990. LFA-3, CD44 and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science.* 249: 1295-1297.
- Wei, X., I.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G. Feng, F. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada & F.Y. Liew.** 1995. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375: 408- 411.
- Weinberg, E.D.** 1992. Iron depletion: a defense against intracellular infection and neoplasia. *Life Sciences.* 50: 1289-1297.
- Weinberg, J.B., M.A. Misukonis, P.J. Shami, S.N. Mason, D.L. Sauls, W.A. Dittman, E.R. Wood, G.K. Smith. B. McDonald, K.E. Bachus, A.F. Haney & D.L. Granger.** 1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood.* 86: 1184-1195.
- Weiss, G., B. Goossen, W. Doppler, D. Fuchs, K. Pantopoulos, G. Werner-Felmayer, H. Wachter & M. W. Hentze.** 1993. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *The EMBO Journal.* 12: 3651-3657.
- Weiss, G., G. Werner-Felmayer, E.R. Werner, K. Grunewald, H. Wachter & M. W. Hentze.** 1994. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *The Journal of Experimental Medicine.* 180: 969-976.
- Weiss, G., C. Bogdan & M.W. Hentze.** 1997. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *Journal of Immunology* 158: 420-425.
- Wheeler, P.R. & C. Ratledge** 1994. Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *In Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control.* B.R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC. 353-385.
- Wong, D., J. Gobin, M.A. Horwitz & B.W. Gibson.** 1996. Characterization of exochelin of *Mycobacterium avium*:: evidence for saturated and unsaturated and for acid and ester forms. *Journal of Bacteriology.* 178: 6394-6398.

- Wright, S.D. & S.C. Silverstein** 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 158: 2016-2023.
- Xie, Q., H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Troso & C. Nathan.** 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256: 225-228.
- Xie, Q. & C. Nathan** 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology* 56: 576-582.
- Xu, S., A. Cooper, S. Sturgill-Koszycki, T. van Heyningen, D. Chatterjee, I. Orme, P. Allen, and D.G. Russell.** 1994. Intracellular trafficking in *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *Journal of Immunology* 153: 2568-2578.
- Yamamoto, K. & R.B.J. Johnston Jr** 1984. Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 159: 405-416.
- Yamamoto, Y., T.W. Klein & H. Friedman.** 1996. Immunoregulatory role of nitric oxide in *Legionella pneumophila*-infected macrophages. *Cellular Immunology* 171:
- Yuan, Y., R.E. Lee, G. S. Besra, J.T. Belisle & C.E. Barry III.** 1995. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92: 6630-6634.
- Zerial, M. & H. Stenmark.** 1993. Rab GTPases in vesicular transport. *Current Opinion in Cell Biology*. 5: 613-620.

0 febr
2008/02
06-06-00

BIBLIOTECA
DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
"ARSA SALAZAR"