



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

ESTUDO COMPARATIVO DA INTERAÇÃO DE *Mycobacterium intracellulare* AVIRULENTA E VIRULENTA COM MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM J774

TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA

Salvador - Bahia
2001



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

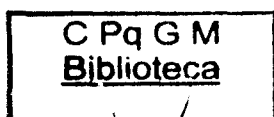
**ESTUDO COMPARATIVO DA INTERAÇÃO DE *Mycobacterium intracellulare*
AVIRULENTA E VIRULENTA COM MACRÓFAGOS MURINOS DA
LINHAGEM J774**

TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA

Orientadora: Patricia Sampaio Tavares Veras

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia
2001



**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
CPqGM/FIOCRUZ – Salvador - Bahia**

Silva, Tânia Regina Marques da
S586e Estudo comparativo da interação de *Mycobacterium intracellulare*
avirulenta e virulenta com macrófagos murinos da linhagem J774 /
Tânia Regina Marques da Silva. - Salvador: Universidade Federal da
Bahia/Fundação Oswaldo Cruz/CPqGM, 2001.
69 p.il.

Mestrado (Dissertação em Patologia Experimental)- Universidade
Federal da Bahia, 2001.

1. *Mycobacterium intracellulare*. 2. Virulência. 3. Interferon
gama. 4. Viabilidade. I. Título.

CDU 616.982.2

11581

02.04

02.04

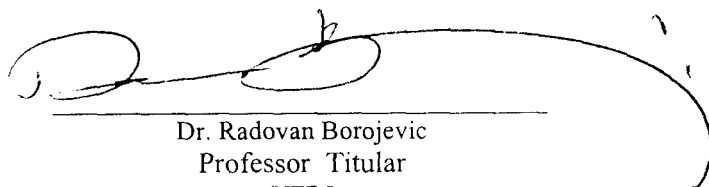
02.04

ESTUDO COMPARATIVO DA INTERAÇÃO DE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE
AVIRULENTA E VIRULENTA COM MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM J774


TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Radovan Borojevic
Professor Titular
UFRJ



Dr. Sérgio Arruda
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Patricia Veras
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Dedico esta Dissertação
a meus queridos
Giovani e Pedro

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Projeto CNPq nº 52063/96-3
- Bolsa de estudos da CAPES de 1999 a 2001.

AGRADECIMENTOS

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Por sua orientação, dedicação e apoio.

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pela consultoria na área de microscopia eletrônica e pelas valiosas sugestões em diversas etapas do trabalho.

Quielan Silva Chagas
Pelo apoio na manutenção de culturas e infecção de células.

Juliana Freitas
Pela realização das técnicas de cultivo, avaliações de NO e processamento do material para microscopia eletrônica.

Cláudio Pereira Figueira
Pelo apoio na preparação de todo o material para análise em microscopia eletrônica.

Rosália Meire Oliveira da Silva
Pela atenção, ajuda e carinho em todos os momentos do curso de Mestrado, em especial durante meu afastamento por licença-maternidade.

Dr. Washington Luiz dos Santos
Pelas indicações metodológicas na avaliação estatística dos dados.

Ana Fiscina Sampaio e todo o pessoal da biblioteca do CPqGM
Pela presteza no atendimento e normatização das referências bibliográficas.

Dr. Lain Pontes de Carvalho e demais integrantes do LIMC
Pela disponibilidade e pelos equipamentos compartilhados.

Amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Celular: Ivana Gomes, Marcus Welby, Valderéz Lemos, Tânia Corrêia, Taís Almeida, Aknar, Felipe, Ignês.
Pelo convívio leve, alegre e cooperativo. De modo especial a Ivana, pelo companheirismo e incentivo.

Tânia de Faria e todo o pessoal de Comunicação Visual e Documentação Científica e Informática do CPqGM
Pelo apoio na elaboração dos recursos visuais necessários em diversos momentos do desenvolvimento deste curso.

Gláide Soares Lucidi
Pela revisão da dissertação.

Silvia Cardoso
Por mostrar o caminho para uma vida nova e realizadora.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CLASSIFICAÇÃO DO COMPLEXO AVIUM-INTRACELLULARE.....	1
1.2	INFECÇÕES MICOBACTERIANAS.....	1
1.2.1	Aspectos gerais	1
1.2.2	Determinantes genéticos	2
1.2.3	Resposta imune à micobactéria.....	4
1.2.3.1	<u>Apresentação e processamento de antígenos</u>	4
1.2.3.2	<u>Produção de citocinas</u>	5
1.2.3.3	<u>Papel do óxido nítrico</u>	7
1.3	INTERAÇÃO DE PATÓGENOS COM FAGÓCITOS MONONUCLEARES.....	9
1.3.1	Receptores envolvidos na fagocitose.....	10
1.3.2	Interação micobactéria-macrófago.....	10
1.3.3	Trajeto intracelular.....	11
1.3.4	Características do fagossoma induzido por micobactéria.....	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos.....	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	20

5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	48
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette Guérin
GM-CSF	Fator estimulador de colônias da monócitos e granulócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LAMP	Glicoproteína de membrana associada a lisossomas
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NK	Células matadoras naturais
Nramp	Proteína de macrófago associada à resistência natural
NO	Óxido nítrico
TGF	Fator de transformação e crescimento
Th	Linfócito T auxiliador
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO DA INTERAÇÃO DE *Mycobacterium intracellulare* AVIRULENTE E VIRULENTE COM MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM J774. **TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA.** *Mycobacterium sp* é um microrganismo intracelular facultativo que vive em macrófagos no interior de fagossomas que restringem a fusão com lisossomas da célula hospedeira. Recentemente foi demonstrado que micobactéria patogênica reside em vacúolos não acidificados. Células J774 pré-ativadas ou não com IFN- γ foram infectadas com *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta na proporção de 10 bacilos por célula. A virulência dos bacilos foi determinada pelas características morfológicas das colônias. Neste trabalho nós avaliamos, comparativamente, a produção de NO pelas células e a viabilidade intracelular dos bacilos. Micobactérias avirulentas induziram maior produção de NO, em comparação com as virulentas. A viabilidade intracelular dos bacilos avirulentos diminuiu pelo tratamento das células com IFN- γ e foi revertida pela adição de AMG, um inibidor da iNOS. A viabilidade da variante virulenta não foi alterada pelo tratamento com IFN- γ ou IFN- γ e AMG. Estudos em microscopia eletrônica foram realizados para avaliar a capacidade de fagossomas fusionarem com lisossomas marcados com partículas de Au-BSA. Vinte e quatro horas após a infecção, 77% de fagossomas contendo micobactéria avirulenta fusionaram com lisossomas, em contraste com 50% de fagossomas contendo micobactéria virulenta. A fusão de fagossomas com lisossomas aumentou com o tratamento por IFN- γ , enquanto que a adição de AMG provocou a redução da fusão de fagossomas formados por micobactéria avirulenta ou virulenta com lisossomas. Demonstramos que a produção de NO é dependente da virulência das micobactérias e que o NO favorece a fusão de fagossomas com lisossomas e diminui a viabilidade dos bacilos. Palavras-chaves: *Mycobacterium intracellulare*. Virulência. Interferon gama. Viabilidade.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY BETWEEN AVIRULENT AND VIRULENT *Mycobacterium intracellulare* AND J774 CELL LINE. **TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA.** *Mycobacterium sp* is a facultative intracellular microorganism that lives in macrophages inside phagosomes that restrict fusion with host cell lysosomes. Recently it has been shown that pathogenic Mycobacteria live in nonacidified vacuoles. Cells pre-activated or not with IFN- γ were infected with 10 bacilli per cell. Bacilli isolated from infected C57BL/6 mice were grown in agar medium and virulence was determined by colony features. We determined the capacity of NO production by J774 cell line with avirulent or virulent mycobacteria and bacilli viability. Avirulent mycobacteria induced a higher NO production in comparison with virulent mycobacteria. The mycobacterium viability was reduced by IFN- γ . This effect was blocked by AMG treatment. Electron microscopy studies were performed to evaluate the capacity of phagosomes to fuse with lysosomes labeled with BSA-colloidal gold particles. In 24h of infection 77% of phagosomes-containing avirulent *M. intracellulare* fused with lysosomes in contrast with 50% of phagosomes-containing virulent bacilli. In J774 cells phagosome fusion with lysosomes was enhanced by IFN- γ treatment. When cells were treated with IFN- γ and AMG, there was a reduction of fusion of phagosome induced by avirulent or virulent mycobacteria with lysosomes and lack of bacillus viability. This data suggests that NO can be important in the fusion of phagosomes with lysosomes. NO production depends on mycobacteria virulence, and NO can induce lack of bacillus viability.

Key Words: *Mycobacterium intracellulare*. Virulence. Interferon gamma. Viability.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CLASSIFICAÇÃO DO COMPLEXO AVIUM-INTRACELLULARE

As micobactérias podem ser classificadas em quatro ou cinco grupos taxonômicos gerais de acordo com a patogenicidade para seres humanos e animais, crescimento à temperatura ótima e efeito da luz visível na produção de pigmentos em cultura (RUNYON, 1974). Micobactérias incluídas no complexo avium-intracellulare (MAC) são bacilos álcool-ácido resistentes, de crescimento lento e que podem produzir um pigmento amarelo, o qual é intensificado pela exposição freqüente à luz.

MAC é um complexo sorológico de 28 sorovars de duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare* (WAYNE & SRAMEK, 1992). Distinções de sorovars dentro do MAC são baseadas em um procedimento de soroaglutinação originalmente descrito por SCHAEFER (1979). A especificidade sorológica para micobactérias que compõem o MAC é conferida por resíduos de glicopeptidolipídios (GPLs), os quais são constituintes integrais da parede e envelope celular da bactéria (BRENNAN, 1989).

Estudos utilizando sondas de DNA específicas para *M. intracellulare* e *M. avium* identificaram que as cepas de sorovar 1-6 e 8-11 pertencem ao grupo *M. avium*, enquanto que sorovar 7 e 12-28 fazem parte de grupo *M. intracellulare* (SAITO et al., 1990; YOSHIMURA & GRAHAM, 1988).

1.2 INFECÇÕES MICOBACTERIANAS

1.2.1 Aspectos gerais

Embora as doenças causadas por micobactérias sejam conhecidas há muitas décadas, pouco se sabe sobre a patogênese dessas doenças. Os seres humanos são susceptíveis a infecções por *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Entretanto, a maioria dos indivíduos expostos a essas bactérias não desenvolve doença clínica, indicando o papel protetor do sistema imunológico (CHESTER & WINN, 1986). Em se tratando de MAC, que são capazes de causar doenças (micobacterioses atípicas) tanto em homens como em animais (ISEMAN et al, 1985; YOUNG et al., 1986), a incidência de doença é

ainda mais baixa (< 10 casos por 100.000 habitantes) a despeito de evidências de taxas de infecção de cerca de 70%.

A via mais provável de penetração de micobactérias oportunistas nos tecidos é através da mucosa brônquica ou intestinal. Anteriormente à epidemia de SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida), a infecção pulmonar era a principal, embora pouco freqüente, manifestação da doença. A disseminação da infecção era rara e ocorria em indivíduos com deficiência na imunidade celular (WOLINSKY, 1984).

Evidências apontam para o trato intestinal como a via primária de infecção por *M. avium* em pacientes com SIDA (GRAY & RABENECK, 1989) e o trato respiratório como uma porta de entrada secundária e menos freqüente (JACOBSON et al., 1991). Portanto, a disseminação da infecção nesses pacientes é geralmente precedida pela colonização do trato gastrointestinal, como evidenciado pelo encontro de grande número de micobactérias na mucosa e submucosa intestinal e freqüência alta de culturas de fezes positivas (BENSON et al, 1990).

A colonização assintomática intestinal e respiratória com *M. avium* pode ser observada em indivíduos sadios, porém o desenvolvimento de doença localizada ou disseminada é raro. Estudos experimentais com animais mostraram que fatores como acloridria gástrica e o uso de antibióticos orais facilitam a colonização por *M. avium*. Entretanto, foi observada variação da virulência de micobactérias quando inoculadas por via oral (BERMUDEZ et al., 1992).

1.2.2 Determinantes genéticos

Em camundongos, a resistência ou susceptibilidade a infecções por patógenos intracelulares não relacionados taxonômica ou antigenicamente é determinada por alelos do locus Bcg no cromossomo 1, também conhecido como Lsh ou Ity. Infecções sob o controle de Bcg incluem muitas espécies micobacterianas (*M. bovis*, *M. avium*, *M. lepraemurium*), *Salmonella typhimurium* e

Leishmania donovani (APPELBERG & SARMENTO, 1990; GROS et al., 1981; PLANT & GLYNN, 1976; SKAMENE et al., 1984; BRADLEY, 1977).

O locus *Bcg* codifica uma fosfoglicoproteína integral de membrana de 110 kD – *Nramp1* (proteína de macrófagos associada à resistência natural) - que é expressa quase que exclusivamente em macrófagos (VIDAL et al., 1996). A susceptibilidade à infecção está associada à substituição de adenina por guanina na posição 596 do gene, resultando na troca do aminoácido glicina por ácido aspártico na posição 169 no domínio transmembrana da proteína, causando a sua rápida degradação (MALO et al., 1994).

Em camundongos susceptíveis, essa mutação é expressa fenotipicamente através da incapacidade de macrófagos restringirem uma rápida replicação microbiana durante a fase inicial da infecção em órgãos do sistema reticuloendotelial. Em contraste, em animais resistentes há ausência de replicação (GROS et al., 1981).

Estudos de imunolocalização têm mostrado que *Nramp1* é expressa em compartimentos marcados positivamente para LAMP1 (glicoproteína de membrana associada a lisossomas), como endossomas tardios e lisossomas de macrófagos, e é recrutada para a membrana do fagossoma através de eventos de fusão durante o processo de maturação que segue a fagocitose (GRUENHEID et al., 1997).

Estudos comparando as propriedades de fagossomas induzidos por *M. bovis* (HACKAM et al., 1998) ou *M. avium* (de CHASTELLIER et al., 1993) em macrófagos de camundongos normais, positivos para *Nramp1*, ou camundongos deficientes para o gene de *Nramp1* demonstraram que esta proteína tem papel chave nos eventos de maturação e acidificação de fagossomas, com conseqüente inibição da replicação da micobactéria.

Com relação a infecções por *M. tuberculosis*, *Nramp1* parece não ter influência na resistência natural contra o patógeno. MEDINA & NORTH (1998), utilizando camundongos deficientes para *Nramp1* e animais selvagens, demonstraram que ambos apresentam o mesmo perfil de resistência à

infecção por *M. tuberculosis*. Esses dados foram recentemente confirmados por NORTH et al (1999). É possível que a capacidade de *M. tuberculosis* de resistir a mecanismos de defesa dependentes de Nramp1 de macrófagos murinos esteja relacionada a fatores de virulência (NORTH et al., 1999).

Embora a função e o mecanismo de ação de Nramp1 permaneçam desconhecidos, sua habilidade em afetar a replicação de diversos grupos de patógenos sugere um papel importante dessa molécula na defesa antimicrobiana (GRUENHEID et al, 1997).

1.2.3 Resposta imune à micobactéria

1.2.3.1 Apresentação e processamento de antígenos

O sucesso na manutenção da infecção micobacteriana é dependente da habilidade do patógeno para evitar a indução de resposta microbicida pelo macrófago hospedeiro. A capacidade da micobactéria de causar níveis de infecção baixos, persistentes e latentes é consequência de algumas das estratégias empregadas para minimizar ou suprimir o desenvolvimento de uma resposta imune (RUSSELL et al, 1994).

Os macrófagos expressam ambas as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II e podem apresentar antígeno tanto para células T citotóxicas CD8⁺ quanto para células T auxiliaadoras CD4⁺ (LOCKSLEY & SCOTT, 1991; SMITH et al., 1991).

Foi sugerido por PANCHOLI et al. (1993) que a capacidade reduzida de macrófagos infectados por BCG de apresentar antígenos micobacterianos se deve ao fato de os bacilos residirem em compartimentos privilegiados, no interior dos quais não ocorre processamento ou complexação de antígenos micobacterianos com moléculas MHC. Anteriormente, já havia sido descrito por HOLSTI & ALLEN (1996) que a internalização da micobactéria e o encontro do antígeno com vacúolos acidificados contendo proteases ativas são necessários para que ocorra apresentação do antígeno. Demonstrou-se também, que *Mycobacterium* pode comprometer a habilidade de macrófagos infectados em estimular a proliferação de células T (MYRVANG et al., 1973; MORENO et al., 1989;

MOLLOY et al., 1990), devido a limitação da capacidade de apresentação de antígeno pela célula hospedeira (KWAN et al., 1992).

1.2.3.2 Produção de citocinas

O controle de infecções micobacterianas por células T CD4+ é dependente de citocinas. Células T auxiliaadoras antígeno-específicas reconhecem antígenos bacterianos apresentados na superfície de macrófagos infectados no contexto de moléculas MHC classe II e secretam citocinas que ativam macrófagos (MURRAY et al., 1999). A ativação de macrófagos por citocinas, isoladas ou combinadas, potencializa a capacidade antimicobacteriana dessas células, resultando no controle da infecção in vitro (FLESCH & KAUFMANN, 1987; APPELBERG & ORME, 1993; ROOK et al., 1986) e in vivo (COOPER et al., 1993; FLYNN et al., 1995).

A IL-12 tem papel essencial na resposta imune contra micobactérias. A função principal da IL-12 é induzir a secreção de IFN- γ , predominantemente por células NK. Tanto células de camundongos quanto de seres humanos deficientes da cadeia p40 do heterodímero IL-12 ou das subunidades do receptor de IL-12 são susceptíveis a infecções micobacterianas. Essa susceptibilidade parece estar relacionada com a menor produção de IFN- γ em comparação às células de indivíduos normais (COOPER et al., 1997; WAKEHAM et al., 1998). Isto foi demonstrado através de experimentos conduzidos com camundongos deficientes para os receptores de IFN- γ e TNF- α (DENIS & GREGG, 1990; FLESCH et al., 1994). Além disso, o IFN- γ ativa macrófagos murinos para inibir a proliferação de alguns isolados de MAC (APPELBERG & ORME, 1993), e, em associação com TNF- α , é capaz de induzir macrófagos a inibir o crescimento de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (ROOK et al., 1986; DENIS & GREGG, 1990; APPELBERG & ORME, 1993).

Apesar de o IFN- γ ser necessário para controlar o crescimento de micobactéria ele não é suficiente (ASTON et al., 1998; BONECINI-ALMEIDA et al., 1998). Evidências apontam para a necessidade de um segundo sinal dependente da expressão de iNOS. A expressão de iNOS é

regulada transcripcionalmente pela ação sinérgica de IFN- γ e de um agonista da via do fator nuclear kB (NFkB) (MARTIN et al., 1994). IFN- γ regula a expressão do fator de transcrição IRF-1, que é essencial para a transcrição de iNOS (KAMIJO et al., 1994), enquanto citocinas como TNF- α ou IL-1 e LPS regulam a translocação nuclear de NFkB, seguindo a degradação de seu inibidor, I κ B. Quando macrófagos são estimulados por LPS e IFN- γ juntos, grandes quantidades da enzima iNOS é produzida, quando comparada com a estimulação por cada agonista sozinho.

TNF- α também tem papel fundamental no controle da infecção micobacteriana. Estudos in vivo e in vitro revelam que o bloqueio de TNF- α ou o uso de camundongos deficientes para p55 TNFR aumenta a proliferação de micobactérias e inibe a produção de NO e formação de granulomas em camundongos infectados com *M. tuberculosis* ou *M. bovis* BCG (KINDLER et al., 1989; KINDLER & SAPPINO, 1991; KRUYSS et al., 1992).

DENIS (1991) demonstrou que TNF- α recombinante associado a GM-CSF induz atividade micobacteriostática e/ou micobactericida em macrófagos infectados por *M. avium*.

Por vezes, a ativação excessiva de macrófagos demanda uma desativação para evitar a destruição tecidual ou efeitos sistêmicos causados por citocinas como TNF- α e IL-1. Muitos mecanismos para desativar macrófagos têm sido propostos, tais como: ausência ou depleção de estímulos, morte dos macrófagos por apoptose ou necrose, ou estimulação por moléculas que antagonizam células ativadas (MURRAY, 1999). Duas citocinas são reconhecidamente desativadoras de macrófagos - IL-10 e TGF- β - e parecem ter papel importante em infecções micobacterianas (BERMUDEZ, 1993; BOGDAN et al., 1991).

Também a IL-6 parece ter efeito supressor na ativação do macrófago (BERMUDEZ et al., 1989; BLANCHARD et al., 1991; DENIS & GREGG, 1990). VANHEYNINGEN et al. (1997) demonstraram que essa citocina é a principal inibidora da linfoproliferação na presença de

macrófagos murinos derivados de medula óssea infectados com micobactérias. Além disso, há evidências de que IL-6 estimula o crescimento de MAC (SHIRATSUCHI et al., 1991).

1.2.3.3 Papel do óxido nítrico

Óxido nítrico (NO) é gerado a partir da L-arginina pela oxidação de um nitrogênio terminal no grupo guanidino, uma reação catalisada pela enzima NO sintetase. Essa família de enzimas compreende pelo menos duas diferentes subfamílias: uma subfamília é dependente de cálcio e calmodulina e é expressa constitutivamente em alguns tipos celulares, notadamente no endotélio e alguns neurônios. A outra subfamília independe de cálcio ou calmodulina e não é expressa constitutivamente: quando ativados, macrófagos e muitos outros tipos celulares podem produzir grandes quantidades de NO por um longo período de tempo.

O processo bioquímico envolvido na síntese de NO não é bem caracterizado, mas sabe-se que requer oxigênio molecular, NADPH e flavina ligada à enzima NO sintetase induzível. NO promove a produção de outros intermediários reativos de nitrogênio, incluindo peroxinitrito e compostos de nitrosotiol, sendo, o nitrito e o nitrato, os produtos finais estáveis e mensuráveis.

NO produzido por células ativadas por citocinas e produtos bacterianos medeia potentes funções antimicrobianas de macrófagos murinos (NATHAN, 1992). IFN- γ e TNF- α têm sido identificados como as citocinas-chave responsáveis pela indução desse mecanismo antimicrobiano (DING et al., 1988). NO secretado por macrófagos e neutrófilos é uma importante, senão a principal, molécula citotóxica efetora na defesa contra células tumorais, fungos, protozoários, helmintos e micobactérias (KOLB & KOLB-BACHOFEN, 1992).

A inibição do crescimento de *M. tuberculosis* e *M. bovis* observada em macrófagos ativados tem sido atribuída à liberação de NO e não parece depender de metabólitos de oxigênio reativo (O_2^- , H_2O_2) (FLESCH & KAUFMANN, 1991).

CHAN et al. (1995) demonstraram que a inibição do crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos estimulados por IFN- γ em conjunto com LPS ou TNF- α foi revertida parcialmente pela adição de um inibidor da iNOS. Esses mesmos autores utilizaram dois inibidores de iNOS (AMG e NNMA) in vivo para tratar camundongos após infecção com *M. tuberculosis* e observaram que os animais não produziram NO e apresentaram maior mortalidade e carga bacilar em seus órgãos, quando comparados com camundongos controles não tratados. Esses resultados foram confirmados por MacMICKING et al. (1997) utilizando camundongos deficientes para o gene de iNOS. FLESCHE & KAUFMANN (1991), estudando macrófagos murinos estimulados por IFN- γ , também demonstraram o papel de NO na inibição do crescimento de *M. bovis* BCG.

Os dados da literatura a respeito da ação do NO no controle da infecção por micobactérias do complexo MAC são controversos. Diferentemente de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, foi demonstrado que a inibição do crescimento de MAC por macrófagos ativados parece não sofrer alteração pela ação do NO (APPELBERG & ORME, 1993), mas sim, parece ser mediada pela produção de superóxido (SARMENTO & APPELBERG, 1996). Estudos in vitro utilizando macrófagos murinos derivados de medula óssea infectados por *M. avium* demonstraram que a maioria das cepas não somente não é eliminada, como persiste e cresce intracelularmente. O crescimento é inibido se macrófagos são tratados com IFN- γ e/ou TNF- α , porém não é revertido pela presença de inibidor da iNOS, L-NMA (N-monometil-L-arginina) (APPELBERG et al., 1994; APPELBERG & ORME, 1993).

Essas observações foram também reportadas por BERMUDEZ (1993). Em estudos utilizando camundongos deficientes para o gene de iNOS foi demonstrado que o crescimento de *M. avium* não é aumentado na ausência de iNOS (DOHERTY & SHER, 1997). Recentemente, GOMES et al. (1999) demonstraram que o NO não participa dos mecanismos antimicobacterianos de macrófagos infectados por *M. avium* e pode contribuir agravando a infecção pela supressão da resposta imune ao patógeno, ao inibir a produção de IFN- γ por células T antígeno-específicas.

Em contrapartida, havia sido demonstrado que macrófagos humanos tratados com TNF- α e infectados com *M. avium* avirulenta exercem função bactericida por um mecanismo dependente de intermediários reativos de nitrogênio (DENIS, 1991). SATO et al. (1998) mostraram também existir correlação entre a atividade anti-bacteriana de macrófagos murinos ativados por IFN- γ contra *M. avium* e a produção de intermediários reativos de nitrogênio.

Os mecanismos antimicrobianos que dependem de intermediários do oxigênio produzidos por macrófagos ativados também parecem não ser importantes para controlar o crescimento da maioria das cepas de *M. avium*, com exceção de poucas, que apresentam virulência limitada (SARMENTO & APPELBERG, 1996).

1.3 INTERAÇÃO DE PATÓGENOS COM FAGÓCITOS MONONUCLEARES

Várias são as estratégias utilizadas por microrganismos patogênicos para a sobrevivência no interior da célula hospedeira. Alguns patógenos, como *Listeria*, *Shigella* e *Trypanosoma* são capazes de romper os fagossomas e se multiplicarem no citosol, enquanto outros, como *Leishmania* e *Coxiella* parecem não ser afetados pelas enzimas hidrolíticas dos lisossomas das células do hospedeiro e permanecem íntegros dentro desses compartimentos.

Existem muitos microrganismos que permanecem em compartimentos delimitados por membranas da célula hospedeira mas modulam a progressão dos fagossomas em fagolisossomas. Estão incluídos neste grupo, *Mycobacterium sp*, *Chlamidia* e *Legionella*. Os vacúolos nos quais esses microrganismos persistem exibem fusão limitada com lisossomas (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994).

1.3.1 Receptores envolvidos na fagocitose

A fagocitose tem início com a ligação dos receptores de superfície dos leucócitos fagocíticos e os ligantes na superfície das partículas a serem fagocitadas, as quais podem estar opsonizadas ou não por imunoglobulinas ou complemento. A fagocitose independente de opsoninas é mediada por moléculas contendo oligossacarídeos na superfície de bactérias e outros microrganismos e ocorre principalmente via receptor manose ou o receptor que reconhece resíduos de β -glicana. Os receptores mais estudados envolvidos na fagocitose dependente de opsoninas são os receptores para a imunoglobulina G (Fc γ R) e complemento. Receptores Fc γ R reconhecem o domínio Fc da imunoglobulina G (IgG) e pertencem a uma superfamília de receptores de membrana semelhantes à imunoglobulina (JONES et al., 1999).

O receptor de complemento CR1 reconhece partículas recobertas por C3b e C4b, enquanto CR3 e CR4, que são membros da família de adesinas celulares, β 2 integrina, reconhecem partículas recobertas por C3bi, uma variedade de ligantes microbicidas, além de outras glicoproteínas. Essa família de receptores (CRs) é expressa em todos os fagócitos mononucleares, o que facilita o acesso de patógenos aos nichos intracelulares (SCHLESINGER, 1998).

1.3.2 Interação micobactéria-macrófago

As células fagocíticas compõem a primeira linha de defesa contra micobactérias. Sua habilidade em inibir o crescimento ou matar a micobactéria determina o curso da infecção (ASTON et al., 1998). As micobactérias são internalizadas por fagócitos mononucleares via receptores específicos (OH & STRAUBINGER, 1996) e residem em compartimentos chamados de fagossomas, que representam adaptações do sistema endossomal da célula hospedeira.

A ligação e a fagocitose de micobactéria pode ser mediada por múltiplos receptores de superfície celular, incluindo receptores para fibronectina, manose, ácido hialurônico, proteína

surfactante A e receptores do complemento (SCHLESINGER et al., 1990; DOWNING et al., 1995). Os receptores do complemento são os principais receptores envolvidos na fagocitose de micobactérias não opsonizadas e opsonizadas.

A resposta celular mediada pelo hospedeiro e o destino do patógeno são influenciados pela interação entre o ligante na superfície do patógeno e os receptores presentes nas células hospedeiras.

A utilização de uma via independente do receptor Fc γ R para a internalização dos bacilos pode proporcionar vantagens para o organismo invasor. Fagocitose de *M. tuberculosis* mediada por CR resulta na formação de fagossomas que não fusionam com lisossomas da célula hospedeira (ARMSTRONG, 1971). Uma outra vantagem é que a ligação com CR3 parece suprimir seletivamente a produção de IL-12, um modulador importante da resposta imune celular contra micobactéria (MARTH & KELSALL, 1997; SUTTERWALA et al., 1997).

Se os bacilos são opsonizados com anticorpos específicos contra *M. tuberculosis*, sua internalização é mediada por receptores Fc γ de macrófagos e o fagossoma micobacteriano sofre completa maturação a fagolisossoma, provavelmente devido a mobilização de vias de sinalização distintas (ARMSTRONG & HART, 1975). Além do mais, foi demonstrado que a fagocitose via receptores Fc γ , mas não via receptores do complemento, está associada à produção de ânion superóxido por células fagocíticas (WRIGHT & SILVERSTEIN, 1983). Sabe-se que MAC, assim como *M. tuberculosis*, sintetizam uma superóxido desmutase que é capaz de inativar o ânion superóxido derivado de macrófago e assim contribuir in vivo para a sobrevivência do bacilo (BERMUDEZ & YOUNG, 1989).

1.3.3 Trajeto intracelular

Após a internalização de partículas inertes, por fagocitose, os fagossomas passam por uma série complexa de eventos de maturação que refletem os estágios da via endossomal-lisossomal

(PITT et al., 1992). A maturação de um fagossoma a fagolisossoma não é um evento simples, resultante da fusão com um único lisossoma, e sim, de fusões múltiplas com lisossomas da célula (DESJARDINS et al., 1994). A fusão de membranas dentro da célula é um fenômeno controlado por uma família heterogênea de proteínas, as SNARE's (receptores solúveis de proteínas de fusão sensíveis a N-etilmeleimida), as quais são também reguladas por outra família heterogênea de proteínas, denominadas pequenas proteínas G da família Rab (ROTHMAN & SOLLNER, 1997). A distribuição dessas proteínas, cujo papel é ligar e hidrolisar o GTP, é diferenciada através da via endocítica (MAYORGA et al., 1989 ; COLOMBO et al., 1992). O ciclo de ligação e hidrólise do GTP regula a taxa de fusão vesicular (LODISH et al, 2000). As interações das proteínas Rab são suplementadas por fatores citosólicos incluindo NSF (proteína de fusão sensível a N-etilmeleimida) e SNAP (proteína solúvel de ligação à NSF) para o ancoramento e posterior fusão de membranas (ROTHMAN & SOLLNER, 1997).

A partícula fagocitada induz a formação de compartimentos com características de endossomas primários, os quais acidificam em pH em torno de 6 e adquirem marcadores de membrana de endossomas primários, como Rab5 e receptor manose. O processo de acidificação é mediado por um complexo de proton-ATPase que se acumula durante a biogênese do endossomo (MAXFIELD & YAMASHIRO, 1987; CASCIOLA-ROSEN & HUBBARD, 1992; FUCHS et al., 1989). Em pH 6,0 alguns ligantes, mais notadamente transferrina ligada ao ferro, se dissociam de seus receptores que reciclam retornando à superfície da célula (GOLDENTHAL et al., 1988). As características do fagossoma continuam a mudar com a aquisição posterior de proteínas transmembranas através da fusão com vesículas.

A diferenciação em endossoma tardio está correlacionada com a posterior queda de pH para cerca de 5,5 e com o surgimento de LAMP, catepsina D, Rab7 e receptor manose-6-fosfato independente de cátion (KORNFELD & MELLMAN, 1989). O receptor manose-6-fosfato é responsável pela entrega de hidrolases lisossomais da via trans-Golgi para o endossoma tardio. Na

maturação para lisossoma, o receptor manose-6-fosfato é removido e a concentração de LAMP e catepsina D aumenta. O pH do lisossoma varia em torno de 4,5 a 5,0 (KORNFELD & MELLMAN, 1989).

1.3.3 Características do fagossoma induzido por micobactéria

O vacúolo induzido por *Mycobacterium* tem capacidade reduzida de fusão com vesículas da via endocítica (FREHEL et al., 1986 ; FREHEL & RASTOGI, 1987 ; SIBLEY et al., 1987). Na ausência de fusão de fagossomas com lisossomas, o ambiente vacuolar permanece próximo à neutralidade, podendo facilitar diretamente a sobrevivência do patógeno (BLACK et al., 1990; CROWLE et al., 1991).

Estudos prévios demonstraram que fagossomas induzidos por MAC e *M. tuberculosis* restringem a fusão com lisossomas (ARMSTRONG, 1971) e acidificam pouco – apresentam pH em torno de 6,5 - (CROWLE et al., 1991) devido a um bloqueio no acúmulo da enzima próton-ATPase vacuolar (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). A exclusão da bomba de proton ATPase pode ser devido a um mecanismo seletivo de inibição da fusão de vesículas contendo bomba de proton com fagossomas em formação ou à rápida remoção da bomba após ter sido entregue ao fagossoma (RUSSELL, 1998).

Apesar de os fagossomas não apresentarem bombas de proton na sua membrana, foi sugerido que eles fusionam livremente com vesículas contendo LAMP (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). XU et al. (1994), utilizando macrófagos murinos derivados de medula óssea, demonstraram que fagossomas formados por *M. tuberculosis* apresentam LAMP em suas membranas. O mesmo foi observado por BARKER et al. (1997) em fagossomas induzidos por *M. marinum*. Em contraste, CLEMENS & HORWITZ (1995), através de estudos quantitativos em ME com monócitos humanos observaram fraca marcação para LAMP em fagossomas induzidos por *M. tuberculosis*. Esses resultados controversos sobre a presença de LAMP na membrana dos vacúolos podem estar

relacionados com diferenças potencialmente significantes entre macrófagos derivados de precursores de medula óssea murino (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994) e derivados de monócitos do sangue periférico humano (CLEMENS & HORWITZ, 1995). Células fagocíticas mononucleares murinas diferem das humanas em vários aspectos, incluindo as respostas à estimulação por citocinas e habilidade em produzir NO e outros intermediários de nitrogênio reativo (BERMUDEZ & YOUNG, 1990).

A presença de LAMP nos fagossomas induzidos por micobactéria não significa que sua concentração seja similar à encontrada em lisossomas, nos quais LAMP recobre completamente a superfície interna da membrana (FUKUDA, 1991). É possível que a presença de LAMP em fagossomas micobacterianos indique alterações no tráfego da via endossomal-lisossomal. Recentemente foi demonstrado que uma significativa porção de LAMP recém-sintetizada é selecionada na via trans-Golgi e transportada até os endossomas primários ou à membrana plasmática. A partir daí, LAMP é endocitado e transportado para endossomas tardios e lisossomas (SCHWEIZER et al., 1996). Talvez seja através dessa via que vesículas contendo LAMP se fusionem com fagossomas de micobactéria.

Existem evidências de que fagossomas de micobactérias apresentam outras características de endossomas primários. Vacúolos contendo micobactéria retém Rab5, a pequena proteína ligadora de GTP, normalmente associada à regulação da fusão de endossomas primários (VIA et al., 1997). Além disso, a transferrina, um marcador de reciclagem endossomal, tem acesso aos fagossomas de micobactérias (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1996; CLEMENS & HORWITZ, 1996), os quais são desprovidos de receptor manose-6-fosfato, um marcador de endossoma tardio (XU et al., 1994). A manutenção dessas características de endossoma primário parece requerer atividade metabólica, uma vez que bacilos mortos são internalizados em vacúolos que acidificam e fusionam com lisossomas (CLEMENS & HORWITZ, 1996). Em estudos utilizando macrófagos murinos da linhagem J774 A1 infectados por *M. bovis* BCG, foi demonstrado que a proteína TACO, presente em macrófagos, é

recrutada e retida ativamente em fagossomas contendo micobactéria viva (FERRARI et al., 1999). Os autores sugerem que esse seria o mecanismo que previne a fusão de fagossomas micobacterianos com lisossomas e permite a sobrevivência dos bacilos no interior de macrófagos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar comparativamente a interação de *M. intracellulare* avirulenta e virulenta com células J774 ativadas por IFN- γ .

2.2 Específicos

Avaliar comparativamente *M. intracellulare* avirulenta e virulenta, quanto à:

2.2.1 Capacidade de infectar células J774.

2.2.2 Indução da produção de NO em células J774 estimuladas por IFN- γ .

2.2.3 Capacidade de induzir fusão de fagossomas por elas formados com lisossomas das células hospedeiras, estimuladas ou não por IFN- γ .

2.2.4 Viabilidade intracelular das micobactérias em células J774 estimuladas ou não por IFN- γ .

3. JUSTIFICATIVA

Micobactérias atípicas são uma causa comum de infecções bacterianas disseminadas em pacientes imunocomprometidos, como aqueles portadores de SIDA. A infecção por micobactérias atípicas aumenta a morbi/mortalidade em indivíduos com imunodeficiência (HORSBURGH, 1991; HORSBURGH & SELIK, 1989). Cerca de 40-50% de todos os pacientes com SIDA estão infectados com MAC e são refratários a antibióticos convencionais e drogas anti-micobacterianas (ARMSTRONG, 1971; FREHEL et al., 1991; MCDONOUGH et al., 1993; BERMUDEZ, 1994; ELLNER et al., 1991). Organismos MAC podem também infectar indivíduos sem imunodeficiências aparentes (PRINCE et al., 1989).

Embora as micobactérias variem largamente em suas virulências, dependendo não somente da espécie, como também da cepa e do tipo morfológico da colônia, elas podem invadir e se replicar no interior de fagócitos mononucleares (CROWLE et al., 1986; FREHEL et al., 1986).

Micobactérias pertencentes ao MAC, quando cultivadas em agar 7H10, produzem variantes de colônias morfológicamente distintas, uma achatada e transparente e outra côncava e opaca (SCHAEFER et al., 1970; CROWLE et al., 1986) (Fig. 3). As variantes opaca e transparente diferem em sua infectividade e susceptibilidade a agentes antimicrobianos. As variantes transparentes são virulentas, sendo capazes de se multiplicar no interior de macrófagos, e são resistentes a drogas. Em contrapartida, as variantes opacas são avirulentas, sendo a maioria eliminada do interior de macrófagos, e susceptíveis a drogas (SCHAEFER, 1970; STORMER & FALKINHAM, 1989). As variantes transparentes e opacas apresentam antigenidades distintas e podem ser convertidas uma na outra (THOREL & DAVID, 1984). Culturas de variantes transparentes produzem colônias opacas numa taxa entre 10^{-4} e 10^{-5} por célula, por geração, enquanto a taxa de aparecimento de colônias transparentes a partir das variantes opacas é de 10^{-6} (WOODLEY & DAVID, 1976).

Uma possível explicação para a baixa resposta a quimioterápicos em pacientes com SIDA infectados por MAC (YOUNG et al., 1986) seria o surgimento de variantes de colônias resistentes a antibióticos. O tratamento com antibióticos pode levar à seleção de variantes não pigmentadas resistentes à droga (STORMER & FALKINHAM, 1989). Além do mais, FREHEL et al. (1997), estudando a resistência de *M. avium* avirulenta ou virulenta à claritromicina, sugerem que micobactérias virulentas são mais resistentes à droga porque restringem a fusão de seus fagossomas com lisossoma, local onde haveria um acúmulo de claritromicina, favorecendo a sua ação sobre o patógeno.

Até o momento, pouco se sabe sobre fatores de virulência que capacitam micobactérias MAC a sobreviver em macrófagos, no interior de fagossomas que retardam a maturação a fagolisossomas. Conhecer melhor a interação entre as variantes avirulenta e virulenta de MAC com a célula hospedeira é importante, pois poderá esclarecer mecanismos que determinam, ou não, uma resposta efetora do hospedeiro à infecção pelas micobactérias do complexo MAC e possibilita a identificação de novos alvos para prevenção e tratamento de infecções micobacterianas.

No presente trabalho, utilizamos micobactérias da mesma cepa que diferem apenas quanto à virulência e estudamos de forma comparativa diversos aspectos da sua interação com a célula hospedeira. Nossa hipótese foi que existiria correlação entre a virulência da micobactéria e a resposta do macrófago quanto à infecção, produção de NO e características dos fagossomas formados pelas micobactérias.



Figura 3. Morfologia das colônias de *Mycobacterium intracellulare*. Avirulenta (A) - opaca, pigmentada e côncava. Virulenta (B) - achatada e transparente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Células

Foram utilizadas células da linhagem macrofágica J774 Clone E. As células foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂ em RPMI (Sigma) suplementado com 25 mM de HEPES (N-2-hidroxetilpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico) pH 7,4 , 2 mM de glutamina , 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 g/l de bicarbonato de sódio, 1,8 µM de 6-tioguanina (Sigma) e 10 % de soro bovino fetal (Hyclone Laboratories) – RPMI completo.

4.2 Bactéria

Foram utilizadas colônias avirulentas e virulentas de *M. intracellulare* cultivadas em ágar 7H10 suplementado com 10% de OADC, a 37°C. Colônias avirulentas e virulentas foram isoladas, respectivamente, a partir de fígado e baço de camundongos C57Bl/6 e BALB/c nu/nu infectados intravenosamente com 10⁶ *M. intracellulare* ATCC 13950 sorovar 16. Após 30 dias, os animais foram sacrificados, fragmentos de fígado e baço foram homogeneizados e cultivados em meio ágar 7H10, por 10 dias, a 37 °C. Colônias com características morfológicas de micobactéria avirulenta (opacas) ou virulenta (transparentes) foram expandidas, distribuídas em alíquotas com 20% de glicerol e congeladas a – 70°C. Dez dias antes de cada experimento, seguido o plaqueamento em 7H10, as colônias eram coletadas, ressuspensas e diluídas em ágar 7H9 para a obtenção da concentração desejada para a infecção.

4.3 Ativação de macrófagos

Macrófagos foram tratados com IFN- γ recombinante (19301T Pharmingen#M0207056 ou R & D#CPF029042) nas concentrações 50, 100, 200 e 400 UI/ml, por um período de 18 horas antes da infecção.

4.4 Infecção de macrófagos

Macrófagos pré-ativados ou não com IFN- γ foram distribuídos na concentração de 5×10^5 células/ml em placas de 24 poços (Costar) contendo lamínulas de vidro, em triplicata, em RPMI completo sem penicilina/estreptomicina (RPMI para infecção). Após 18 horas de incubação a 37°C e 5% CO $_2$, as células foram infectadas por *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta na proporção de 10 bacilos por célula, e novamente incubadas nas mesmas condições. Seguidas as 24 horas, o sobrenadante foi colhido para a determinação da produção de óxido nítrico (NO) e as lamínulas retiradas, fixadas com glutaraldeído a 2% por 20 minutos e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen.

4.5 Determinação do percentual de células infectadas

Após a coloração, as lamínulas foram montadas em lâminas e observadas ao microscópio ótico (magnificação x1000). Um mínimo de 200 macrófagos por grupo, em triplicata, foram contados para a determinação do percentual de células contendo micobactéria.

4.6 Determinação da produção de NO

A produção de NO foi determinada através do método de Griess (DING et al., 1988), a partir da quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas. A curva padrão de leitura foi construída a partir de uma solução de nitrito de sódio a 200 μ M em RPMI, seguida de diluições seriadas (1:2), distribuídos em triplicatas, em placas de 96 poços. A revelação foi feita com a adição de solução à

base de sulfanilamida 1% e N-1 naftiletilenodiamina (NEED), na proporção de 1:2. A leitura foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda 570 nm e analisada no programa SOFTMAX 6.

Para a avaliação da inibição da produção de NO, as células foram previamente tratadas com 1 mM de aminoguanidina (AMG) e 100 UI/ml de IFN- γ por um período de 18 horas antes da infecção por micobactéria avirulenta ou virulenta. Os resultados foram expressos em concentração de nitrito (μM).

4.7 Determinação da viabilidade intracelular de micobactéria avirulenta e virulenta.

As células J774 foram distribuídas em duplicata em placas de 24 poços (Costar). Após ativação ou não com IFN- γ , foram infectadas por 24 horas, com 10 bacilos por célula, como descrito acima. Em seguida, as células foram descoladas dos poços, contadas e lisadas com solução de SDS-0,1% na presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de inibidor de proteases (PMSF, TPCK, TLCK, NPGB). O lisado foi então centrifugado por 3 minutos a 12.000 g e as micobactérias livres foram ressuspensas em 1 ml de meio ágar 7H9. As suspensões de micobactérias foram, então, submetidas a diluições sucessivas até 10^{-4} e espalhadas em placas de petri com ágar 7H10. Após 10 dias de cultura, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado e a relação micobactéria por célula determinada. Os resultados foram expressos em UFC/ 10^6 células ou aumento ou diminuição (%) das UFC/ 10^6 células em relação ao controle.

4.8 Determinação da fusão de fagossoma com lisossoma através de microscopia eletrônica.

Macrófagos ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram distribuídos em placas de petri (Costar) e incubados com partículas de ouro coloidal (15 nm) conjugada a albumina bovina (BSA) por quatro horas. Após esse período, macrófagos foram lavados, tratados com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG em meio RPMI para infecção. Em seguida, as células foram incubadas por 18 horas, a 37°C

e 5% CO₂, período necessário para o ouro coloidal se acumular apenas em compartimentos lisossomais. As células foram então infectadas por *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta, como descrito acima. Após 24 horas, as células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, pós-fixadas em tetróxido de ósmio e finalmente, em acetato de uranila. Amostras foram desidratadas em soluções de acetona e embebidas em resina Epon.

A distribuição de micobactérias por vacúolos foi quantificada pela contagem de 150 a 200 vacúolos por grupo. A fusão de fagossomas com lisossomas foi considerada quando pelo menos uma partícula de ouro coloidal era visualizada no vacúolo micobacteriano. Os resultados foram expressos em aumento ou diminuição (%) do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao controle não tratado.

4.9 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graph Pad Prisma versão 3.0. Os testes utilizados, quando indicados no texto, foram ONE-WAY ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls (NK) e test t de *Student*. “n “ representa o número de experimentos.

5. RESULTADOS

5.1 Produção de NO por células J774 infectadas por *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta.

Óxido nítrico (NO) é uma molécula microbicida (NATHAN, 1992) produzida por macrófagos murinos ativados. Foi questionado se *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta eram capazes de induzir a produção de NO de forma diferenciada em células J774 previamente ativadas por IFN- γ . Após 24 horas de infecção, os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes das culturas de células J774 previamente tratadas ou não com diferentes concentrações de IFN- γ por um período de 18 horas. A produção de NO nos sobrenadantes das células foi avaliada através da determinação de nitrito pelo método de Griess.

A figura 5.1 mostra que células J774 infectadas por micobactérias avirulentas (n =11) ou virulentas (n =7) produzem baixos níveis de NO ($1,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e $1,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$, respectivamente). O tratamento com IFN- γ em todas as concentrações utilizadas induziu um aumento da produção de NO pelas células, sendo de $18,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$ quando as células foram infectadas por micobactérias avirulentas em comparação com $7,7 \pm 2,4 \mu\text{M}$ produzido pelas células infectadas pela micobactérias virulentas. A produção de NO nas células infectadas por micobactérias avirulentas tratadas por IFN- γ foi dose-dependente. No entanto, a produção de NO pelas células infectadas por micobactérias virulentas se manteve constante mesmo com a adição de 400 UI/ml de IFN- γ . O número de experimentos para células tratadas com 100, 200 e 400 UI/ml de IFN- γ infectadas por micobactérias avirulentas foi, respectivamente, 11, 5 e 2, e por micobactérias virulentas foi respectivamente, 7, 2 e 2 (ANOVA, $p < 0,0001$) (NK, 100 UI/ml de IFN- γ , $p < 0,05$; 200 UI/ml de IFN- γ , $p > 0,05$; 400 UI/ml de IFN- γ , $p < 0,05$). Foi utilizada, também, a concentração de 50 UI/ml de IFN- γ (dado não mostrado).

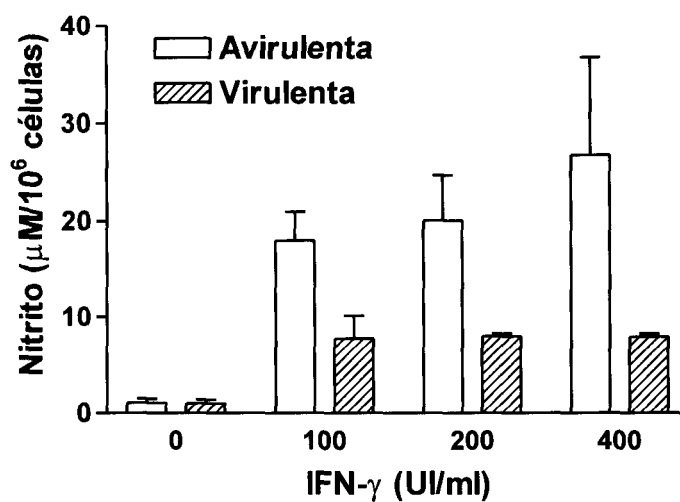


Figura 5.1 Produção de NO por células infectadas por micobactéria avirulenta ou virulenta. Os sobrenadantes das células tratadas ou não com diferentes concentrações de IFN- γ e infectadas por micobactérias avirulentas ou virulentas foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem dos níveis de NO. Os resultados representam médias de experimentos.

5.2 Inibição da produção de NO pela aminoguanidina (AMG).

Para avaliar se a produção de NO pelas células J774 tratadas com IFN- γ e infectadas por micobactérias avirulentas ou virulentas foi devido à ação da enzima NO sintetase induzível (iNOS), as células J774 foram previamente tratadas por 18 horas com 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG, um inibidor competitivo da produção de NO pela iNOS. Vinte e quatro horas após a infecção, os sobrenadantes das células J774 foram colhidos para a determinação dos níveis de NO.

Como mostrado na Figura 5.2, nos grupos tratados com IFN- γ e AMG houve uma completa inibição da produção de NO por células infectadas por micobactérias avirulentas (n=3) ou virulentas (n=2), indicando que o mecanismo de produção de NO é dependente da ação de iNOS. Nos experimentos que se seguiram utilizamos a AMG associada ao IFN- γ quando desejávamos inibir a síntese de NO ou isolada, como controle.

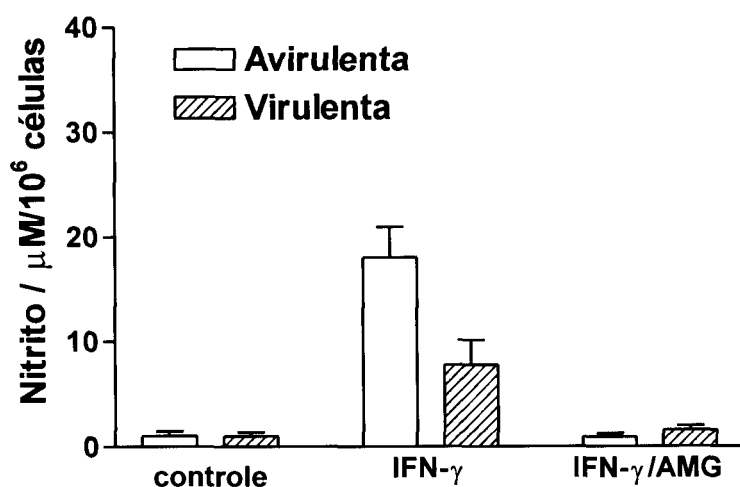


Figura 5.2 Inibição da produção de NO pela AMG. As células foram tratadas ou não com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG por 18 horas. Após 24 horas de infecção com micobactéria avirulenta ou virulenta, o NO foi dosado como descrito anteriormente. O tratamento por AMG inibiu completamente a produção de NO por células tratadas por IFN- γ e infectadas com micobactérias avirulentas (n=2) ou virulentas (n=3), quando comparados com o grupo tratado apenas por IFN- γ . Os grupos tratados por IFN- γ e os grupos controles representam a média de 11 experimentos para micobactérias avirulentas e sete experimentos para micobactérias virulentas.

5.3 Avaliação do percentual de células infectadas por *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta.

A capacidade de micobactérias avirulentas e virulentas de infectar células J774 foi avaliada através do cálculo do percentual de células infectadas, com a utilização do microscópio ótico.

A Figura 5.3.1 mostra que micobactérias avirulentas e virulentas têm capacidade similar de infectar células J774. O percentual de células infectadas foi de $76,2 \pm 3,1\%$ ($n=12$) para infecção por micobactéria avirulenta e de $80,3 \pm 5,1\%$ ($n=5$) para infecção pelas virulentas (t de Student, $p=0,4892$). Com o objetivo de avaliar se, ao menos nas primeiras 24 horas de infecção, a ativação por IFN- γ ou a inibição da produção de NO pela AMG levaria a uma alteração no percentual de células infectadas por uma ou outra micobactéria, as células J774 foram previamente tratadas com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG, por um período de 18 horas. Como mostrado na Figura 5.3.2 não houve diferença no percentual de células infectadas por *M. intracellulare* avirulenta entre os grupos tratados com IFN- γ ($n=12$) ou IFN- γ e AMG ($n=5$), cujos valores foram $77,8 \pm 3,0\%$ e $83,2 \pm 5,0\%$, respectivamente, em relação ao grupo sem tratamento $76,2 \pm 3,1\%$ (ANOVA, $p=0,4669$). Na Figura 5.3.3 observa-se que tanto a adição de IFN- γ ($88,7 \pm 4,4\%$, $n=5$) quanto a adição de IFN- γ e AMG ($89,3 \pm 5,3\%$, $n=3$) induziram um aumento não significativo (ANOVA, $p=0,2623$) no percentual de células infectadas por *M. intracellulare* virulenta em comparação a $80,3 \pm 5,1\%$ no grupo não tratado.

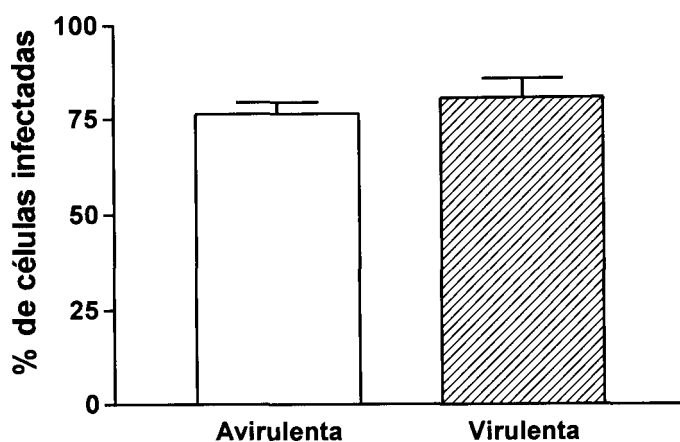
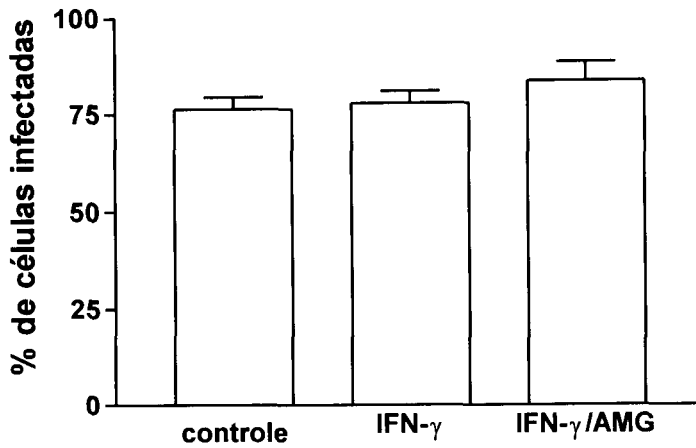


Figura 5.3.1 Percentual de células infectadas por *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta. Células J774 (5×10^5 /ml) foram infectadas com *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta (10 bacilos por célula). Após 24 horas de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen para contagem do número de células contendo micobactérias. Não houve diferença entre os grupos infectados por *M. intracellulare* avirulenta ($n=12$) ou virulenta ($n=5$); (t de Student, $p=0,4892$).

A



B

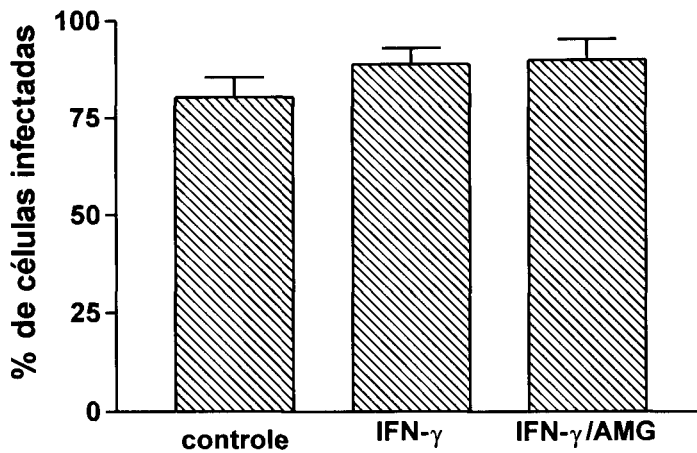


Figura 5.3.2 Percentual de células infectadas por *M. intracellulare* avirulenta (A) ou virulenta (B) tratadas por IFN- γ ou IFN- γ e AMG. Células J774 (5×10^5 /ml) foram tratadas com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG e infectadas com *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta (10 bacilos por célula). Após 24 horas de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído e coradas pelo método de Zielh-Nielsen para contagem do número de células contendo micobactérias. Não houve diferença entre os grupos infectados com micobactérias avirulentas não tratados ($n=12$) ou tratados por IFN- γ ($n=12$) ou IFN- γ e AMG ($n=5$); (ANOVA, $p=0,4669$). Também, não houve diferença no percentual de células infectadas com micobactérias virulentas entre os grupos não tratados ($n=5$) ou tratados por IFN- γ ($n=5$) ou IFN- γ e AMG ($n=3$); ANOVA, $p=0,2623$).

5.4 Avaliação da viabilidade intracelular de micobactérias avirulentas ou virulentas.

Avaliamos inicialmente se haveria, no tempo de 24 horas, diferenças na viabilidade das micobactérias morfologicamente distintas, sabidas por apresentarem diferenças na capacidade de infectar camundongos (STORMER & FALKINHAM, 1989). Ao menos nesse tempo de infecção, observamos que não houve diferença entre a viabilidade de micobactérias avirulentas ($2,0 \pm 1,2$ UFC por 10^6 células) e virulentas ($3,3 \pm 1,4$ UFC por 10^6 células) no interior da células J774 (t de Student, $p=0,5324$) (Fig. 5.4.1).

Embora tenhamos observado que o tratamento com IFN- γ ou IFN- γ e AMG não modificou o percentual de células infectadas, foi avaliado se essas moléculas teriam alguma interferência na viabilidade das micobactérias até 24 horas após a infecção. Dessa forma, as células foram tratadas ou não com IFN- γ ou IFN- γ e AMG e infectadas como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram lisadas, diluídas em série até 10^{-4} e plaqueadas em 7H10. Após dez dias, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e o número de bacilos por célula foi avaliado.

A Figura 5.4.2 mostra que nas células infectadas por micobactérias avirulentas o tratamento com IFN- γ (n=3) levou a uma diminuição de 38,8% da viabilidade dos bacilos, quando comparados com os grupos não tratados (n=3), porém, não estatisticamente significativa (NK, $p>0,05$), enquanto que o tratamento com IFN- γ e AMG (n=3) levou a um aumento de 102,5% da viabilidade dos bacilos quando comparados com o grupo controle (NK, $p<0,05$). A comparação entre o grupo tratado apenas com IFN- γ e o tratado com IFN- γ e AMG mostrou uma diferença estatisticamente significativa (NK, $p<0,01$) (ANOVA, $p<0,0015$).

Nas células infectadas por micobactérias virulentas os tratamentos com IFN- γ (n=4) e IFN- γ e AMG (n=4) induziram um discreto aumento da viabilidade dos bacilos (11,1% e 16,5%,

respectivamente), não estatisticamente significativa, quando comparados com o grupo sem tratamento (ANOVA, $p=0,9147$). Os dados são expressos em aumento ou diminuição percentual de UFC por 10^6 células em relação ao controle não tratado.

Tabela 5.4 Avaliação da viabilidade intracelular de micobactéria avirulenta ou virulenta

Avirulenta – UFC/ células				Avirulenta - % controle		
Exp	controle	IFN- γ	IFN- γ /AMG	Exp	IFN- γ	IFN- γ /AMG
1	0,72	0,5	2,25	1	-30,56	124,28
2	0,89	0,44	2,06	2	-50,56	131,46
3	4,41	2,86	6,69	3	-35,15	51,7

Virulenta – UFC/ células				Virulenta - % controle		
Exp	controle	IFN- γ	IFN- γ /AMG	Exp	IFN- γ	IFN- γ /AMG
1	2,23	3,34	0,96	1	49,8	-56,9
2	6,88	10,9	5,77	2	58,4	-16,1
3	0,38	0,2	0,89	3	-47,4	134,2
4	3,66	3,06	3,84	4	-16,4	4,9

Avaliação da viabilidade intracelular de micobactéria avirulenta ou virulenta. As células J774 não tratadas e tratadas foram infectadas como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram lisadas, diluídas em série até 10^{-4} e plaqueadas. O número de bacilos por célula foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) como descrito em Material e Métodos.

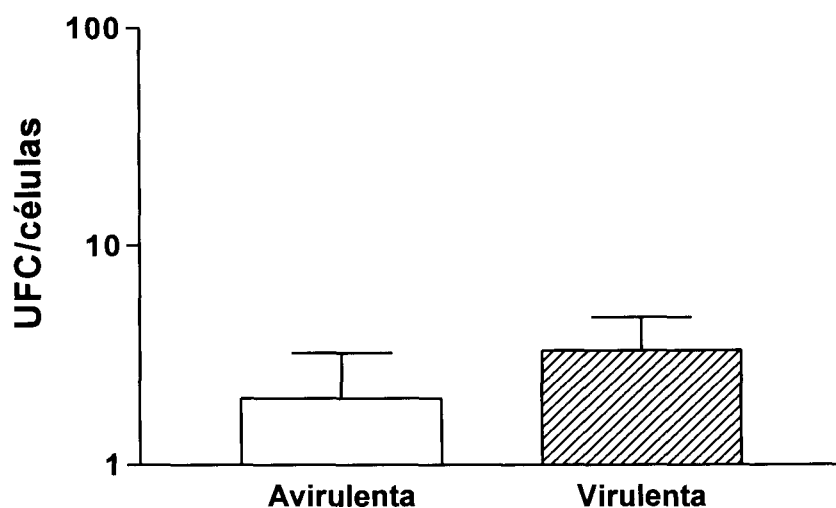


Figura 5.4.1 Avaliação da viabilidade intracelular de micobactéria avirulenta ou virulenta. As células não tratadas foram infectadas como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram lisadas, diluídas em série até 10^{-4} e plaqueadas. O número de bacilos por célula foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Não houve diferença entre a viabilidade de micobactérias avirulenta (n=3) e virulenta (n=4) no interior de células J774 (t de *Student*; p=0,5324).

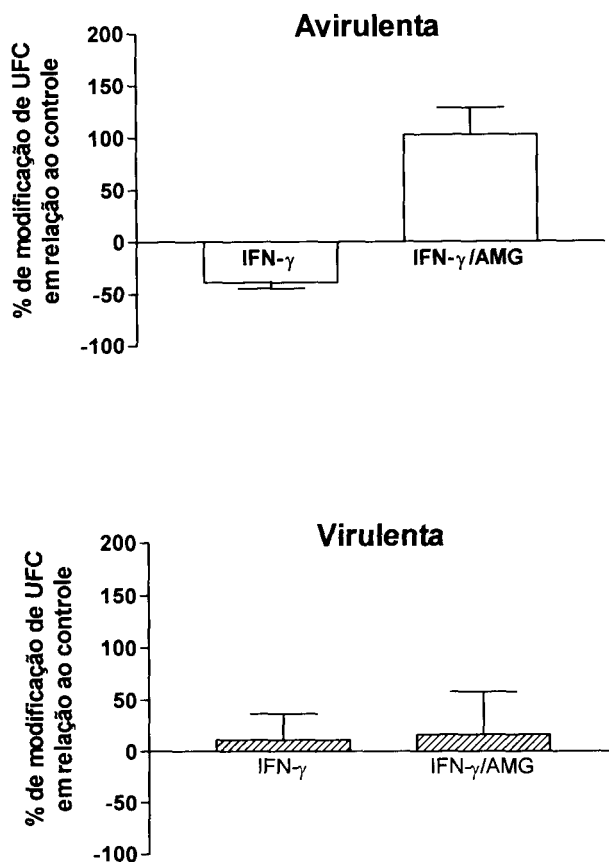


Figura 5.4.2 Avaliação da viabilidade intracelular de micobactéria avirulenta ou virulenta tratadas por IFN- γ ou IFN- γ e AMG. As células foram tratadas ou não por IFN- γ ou IFN- γ e AMG e infectadas como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram lisadas, diluídas em série até 10^{-4} e plaqueadas. O número de bacilos por célula foi estimado através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Em células infectadas por micobactéria avirulenta houve uma diminuição de 38,8% da viabilidade dos bacilos em relação ao grupo não tratado (NK, $p > 0,05$), enquanto que o tratamento com IFN- γ e AMG ($n=3$) induziu um aumento de 102,5% (NK, $p < 0,01$) da viabilidade em relação ao grupo controle (ANOVA, $p=0,0015$). Nas células infectadas por micobactéria virulenta o tratamento com IFN- γ ($n=4$) ou IFN- γ e AMG ($n=4$) não alterou a viabilidade dos bacilos (ANOVA, $p=0,9147$).

5.5 Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta ou virulenta com lisossomas de células J774.

Em seguida, fizemos a caracterização dos fagossomas induzidos pelas micobactérias conhecidas na literatura por apresentarem virulências distintas (STORMER & FALKINHAM, 1989). Marcamos, inicialmente, os compartimentos lisossomais das células, incubando-as na presença de ouro coloidal por um período de quatro horas. As culturas foram lavadas para retirar o excesso de ouro não internalizado e tratadas ou não com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG, sendo então, incubadas por mais 18 horas. Em seguida, as células foram infectadas com micobactérias avirulenta ou virulenta, como descrito anteriormente, fixadas e processadas para análise em microscopia eletrônica (ME). Foi considerado que os fagossomas fusionaram com lisossomas, para formar fagolisossomas, quando pelo menos uma partícula de ouro coloidal foi vista no interior dos vacúolos contendo micobactéria avirulenta ou virulenta.

A Figura 5.5.2 mostra que $77,2 \pm 6,4\%$ dos fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta (n=2) fusionaram com lisossomas (Fig. 5.5.1 A-D), em contraste com $50,8 \pm 10,4\%$ de fagossomas induzidos por micobactéria virulenta (n=3). Embora o percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta com lisossomas seja 51,8% superior ao percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria virulenta, essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,1626). A Figura 5.5.1 E-H mostra imagens representativas de fagossomas contendo micobactérias virulentas que não fusionaram com lisossomas.

Nos grupos infectados por micobactéria avirulenta o tratamento com IFN- γ (n=2) não modificou o percentual de fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao controle (n=2) (aumento de $1,5 \pm 0,3\%$ em relação ao controle). Entretanto, no grupo tratado com IFN- γ e AMG (n=2) foi observada uma redução de $10,6 \pm 1,1\%$ na fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao grupo controle (NK, p<0,01). Quando

comparados, o grupo tratado apenas com IFN- γ e o tratado com IFN- γ e AMG mostraram diferença estatística (NK, $p < 0,01$) (ANOVA, $p = 0,0016$) (Fig. 5.5.3).

Em células infectadas por micobactéria virulenta o tratamento por IFN- γ ($n=3$) induziu um aumento de $6,4 \pm 4,7\%$ do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas quando comparadas ao grupo controle ($n=3$). Além do mais, o tratamento com IFN- γ e AMG ($n=3$) reduziu de $6,7 \pm 5,9\%$ a fusão dos fagossomas quando comparados ao controle (Fig. 5.5.4). Entretanto, essas diferenças observadas não mostraram significância estatística (ANOVA, $p = 0,1866$). Os resultados são expressos em aumento ou diminuição (%) percentual da fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao controle.

Tabela 5.5 Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta ou virulenta com células J774

Avirulenta - % fusão fagossoma-lisossoma				Avirulenta - % controle		
Exp	controle	IFN- γ	IFN- γ /AMG	Exp	IFN- γ	IFN- γ /AMG
1	70,8	71,7	62,5	1	1,27	-11,72
2	83,5	85	75,5	2	1,8	-9,58

Virulenta - % fusão fagossoma-lisossoma				Virulenta - % controle		
Exp	controle	IFN- γ	IFN- γ /AMG	Exp	IFN- γ	IFN- γ /AMG
1	35,8	39,1	29,2	1	9,2	-18,43
2	45,8	51,7	45,6	2	12,88	-0,44
3	70,9	68,9	70,1	3	-2,82	-1,132

Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta ou virulenta com lisossomas de células J774. As células foram incubadas com ouro coloidal por quatro horas e, em seguida, lavadas e novamente incubadas por mais 18 horas. A infecção foi feita como nos experimentos anteriores. A determinação do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas foi feita através de microscopia eletrônica, pela contagem de fagossomas contendo pelo menos uma partícula de ouro.

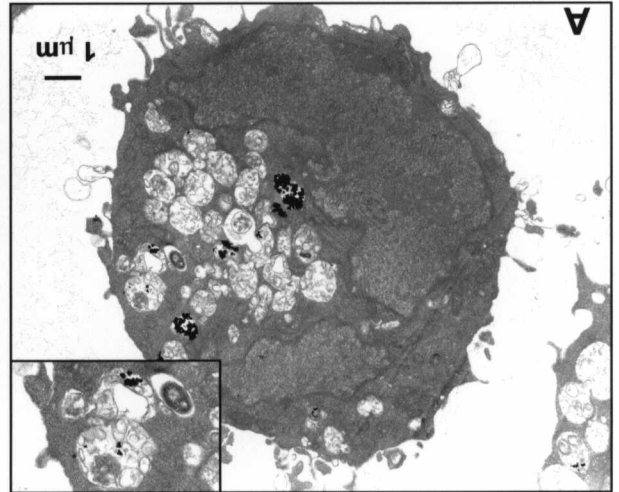
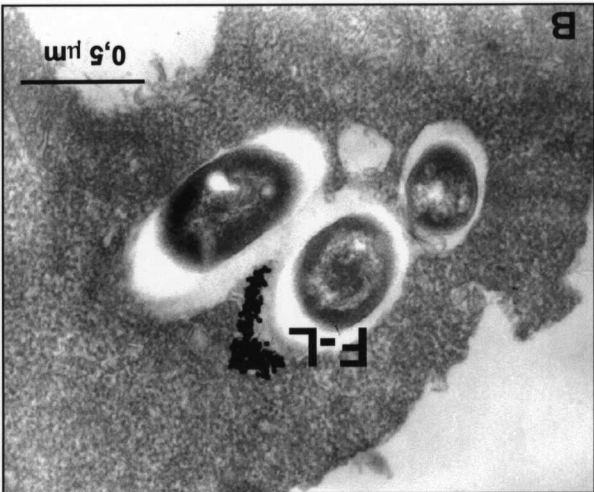
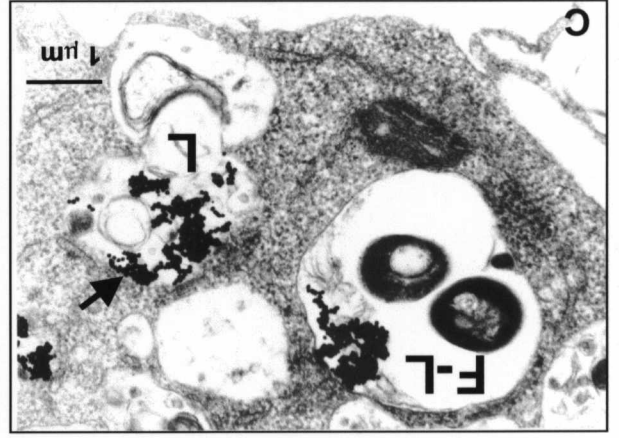
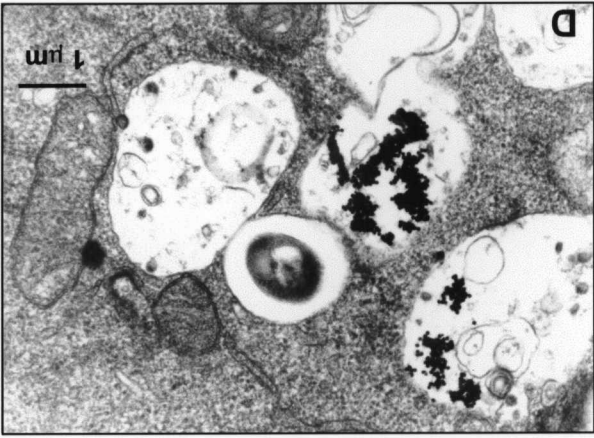
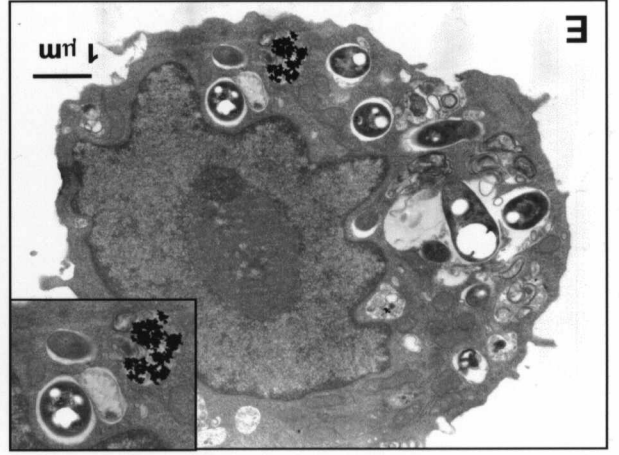
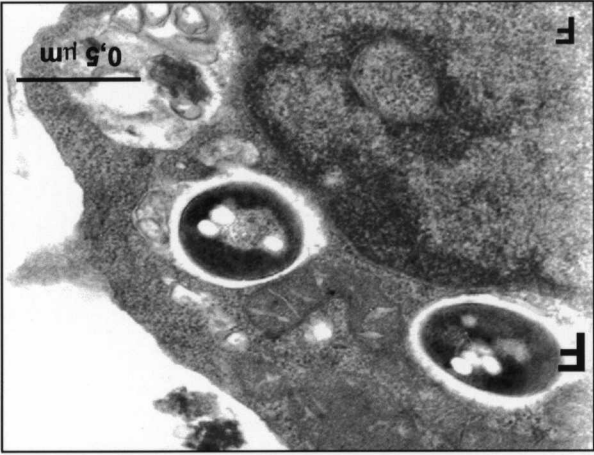
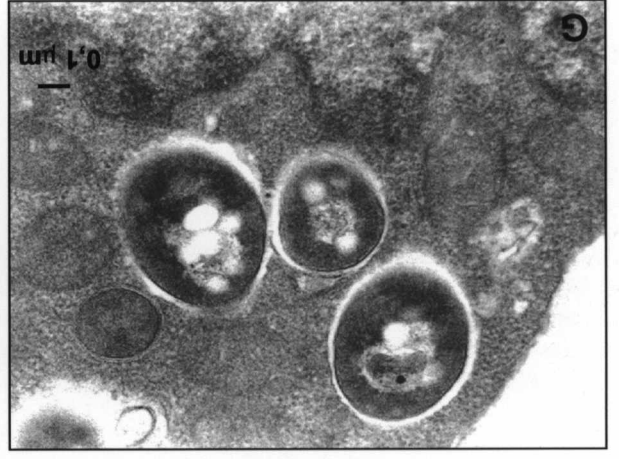
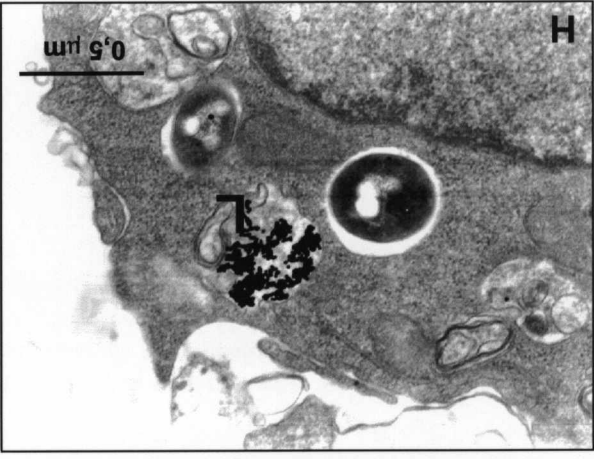


Figura 5.5.1. Caracterização ultra-estrutural de fagossomas induzidos por micobactérias avirulentas e virulentas. As imagens A-D mostram células J774 infectadas por micobactérias avirulentas em fagossomas que fusionaram com lisossomas, formando fagolisossomas (F-L). A seta na imagem C indica a presença de ouro coloidal no interior do lisossoma (L). As imagens E-H mostram células J774 infectadas por micobactérias virulentas em fagossomas (F) que não fusionaram com lisossomas (L). Vide página anterior.

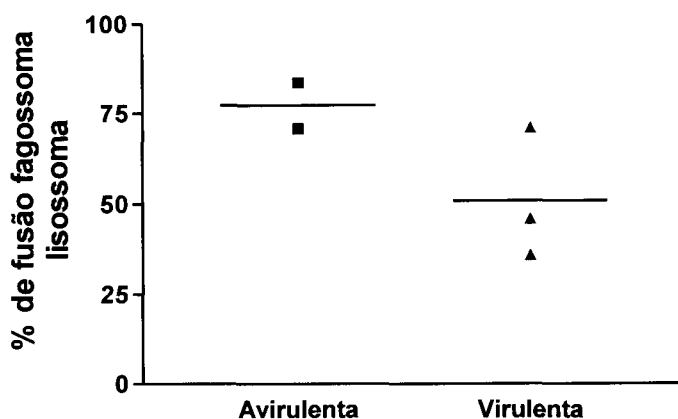


Figura 5.5.2 Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta ou virulenta com lisossomas de células J774. As células foram incubadas com ouro coloidal por quatro horas e em seguida lavadas e novamente incubadas por mais 18 horas. A infecção foi feita como nos experimentos anteriores. A determinação do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas foi feita através de microscopia eletrônica, pela contagem de fagossomas contendo pelo menos uma partícula de ouro. Fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta (n=2) apresentam maior percentual de fusão com lisossomas quando comparados com micobactéria virulenta (n=3) entretanto, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa devido à variabilidade das amostras (t de *Student*, $p=0,1626$). n=número de experimentos.

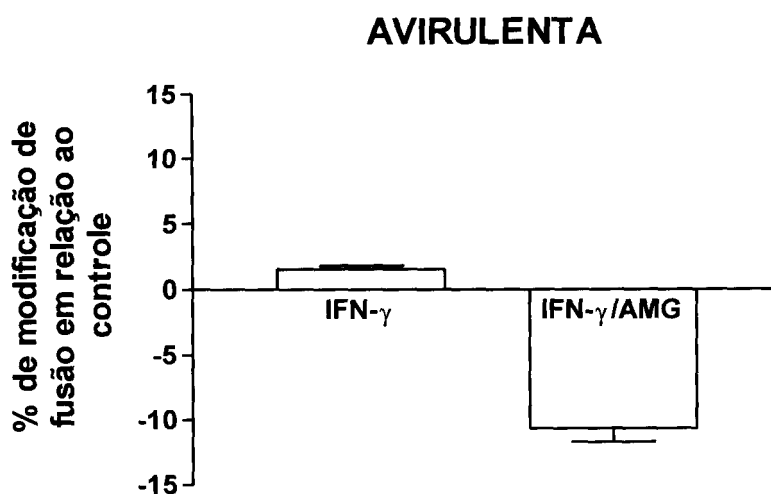


Figura 5.5.3 Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta com lisossomas de células tratadas com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG . A marcação dos compartimentos lisossomais, assim como o tratamento das células por IFN- γ ou IFN- γ e AMG e a infecção foram realizados como descrito anteriormente. O tratamento por IFN- γ não alterou o percentual de fusão de fagossomas com lisossomas (n =2) em relação ao grupo controle (NK, $p > 0,05$), enquanto que no grupo tratado com IFN- γ e AMG (n=2) houve uma redução significativa do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao grupo controle (NK, $p < 0,01$)(ANOVA, $p = 0,0016$).

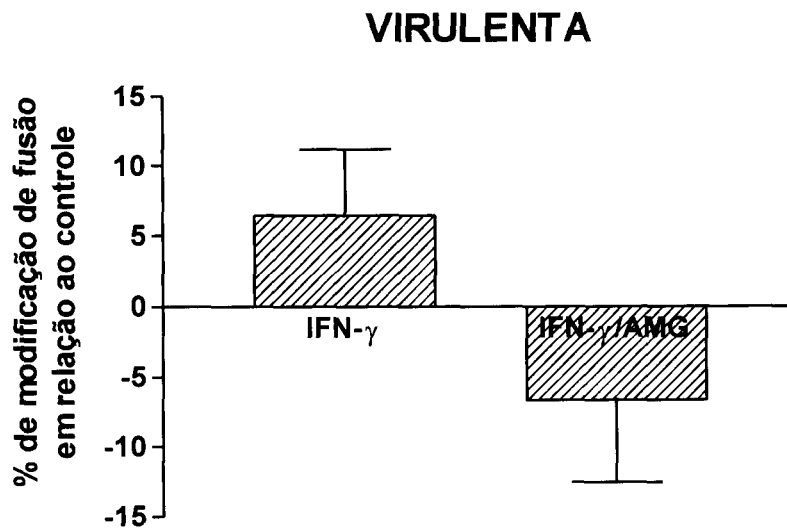


Figura 5.5.4 Avaliação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria virulenta com lisossomas de células tratadas com 100 UI/ml de IFN- γ ou 100 UI/ml de IFN- γ e 1 mM de AMG . O tratamento das células com IFN- γ (n =3) levou a um aumento de $6,42 \pm 4,74\%$ de fusão de fagossomas com lisossomas de células J774 quando comparados com o grupo controle (n =3). No grupo tratado com IFN- γ e AMG (n=3) houve diminuição de $6,67 \pm 5,89\%$ de fusão de fagossomas com lisossomas em relação ao grupo controle. Essas diferenças observadas não foram estatisticamente significantes (p=0,1866).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como finalidade caracterizar a interação entre *M. intracellulare* avirulenta ou virulenta e macrófagos murinos de linhagem, células J774. Avaliamos diferenças entre as micobactérias avirulentas e virulentas quanto a capacidade em infectar células J774 e produzir NO. Em seguida, avaliamos as características do compartimento induzido por uma ou outra micobactéria.

Nosso estudo mostra pela primeira vez que a produção de NO, induzido pelo IFN- γ em células infectadas, depende da virulência da micobactéria. Nós demonstramos que, em células não estimuladas, ambas as variantes de micobactérias induzem uma pequena produção de NO. O pré-tratamento com 100 UI/ml de IFN- γ seguido da infecção por micobactérias avirulenta ou virulenta induziu um aumento da produção de NO de 17 vezes (avirulenta) e 7 vezes (virulenta) em relação aos grupos não tratados. O tratamento com AMG, um inibidor da produção de NO, inibiu completamente a produção de NO pelas células tratadas por IFN- γ e infectadas pelas duas variantes de micobactérias, demonstrando que o NO produzido pelas células J774 tratadas por IFN- γ e infectadas pelas micobactérias é dependente da NO sintetase induzível (iNOS).

O fato de a micobactéria virulenta induzir uma menor produção de NO por células J774 estimuladas por IFN- γ em relação à micobactéria avirulenta pode estar relacionado com mecanismos de defesa dessa variante de micobactéria, mecanismos esses que facilitariam a sua sobrevivência in vivo. A presença de glicolipídios, como lipoarabinomanana, e de glicoproteínas na superfície das micobactérias está associada à habilidade desses microorganismos de invadir e sobreviver intracelularmente. Sabe-se que as variantes virulentas apresentam uma camada externa de polissacarídeos na parede celular, ausente nas variantes avirulentas (PRINZIS et al, 1994; RASTOGI et al, 1981; BARROW et al, 1998). É possível que essa camada impeça a interação de ligantes expostos na parede da micobactéria com receptores celulares. A micobactéria avirulenta pode estar,

direta ou indiretamente, gerando o segundo sinal para a indução da produção de NO, ou via a ligação de ligantes da superfície bacteriana com supostos receptores celulares, e/ou através da produção de TNF- α .

Nas primeiras 24 horas de infecção, não observamos diferenças no percentual de células infectadas pela micobactéria avirulenta, em resposta ao tratamento por IFN- γ , porém foi detectada diminuição de 38,8% da viabilidade dessas micobactérias, não estatisticamente significativa. É possível que, em tempos mais tardios de infecção, diminuição mais acentuada da viabilidade da micobactéria avirulenta, acompanhada de queda no percentual de células infectadas, venha a ser detectada. O fato de o tratamento com AMG reverter a queda da viabilidade da micobactéria avirulenta induzido pelo tratamento com IFN- γ demonstra que o NO participa da morte dos bacilos.

A queda da viabilidade não foi observada em células tratadas com IFN- γ e infectadas pela variante virulenta. É possível que a cápsula que envolve a micobactéria virulenta possa prevenir ou retardar a difusão de enzimas lisossômicas através do bacilo, caso tenha havido fusão com lisossomas (FREHEL, 1986).

Em experimentos preliminares observamos que a adição de um doador químico de NO, o SNAP (n-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) nas culturas de células infectadas por micobactéria virulenta induziu a produção de altas concentrações de NO (100 μ M) e a diminuição da viabilidade dessa variante de micobactérias do complexo MAC de 63,8% em relação ao grupo controle. Isso sugere que a incapacidade do IFN- γ , adicionado às culturas de células J774, em diminuir a viabilidade da variante virulenta de MAC depende provavelmente da pequena concentração de NO produzido pelas células. Esses dados demonstram que existe uma associação entre a quantidade de NO e a capacidade de reduzir a viabilidade de micobactérias do complexo MAC.

Os resultados controversos da literatura sobre o efeito do NO na destruição de micobactérias do complexo MAC (GOMES et al., 1999), podem estar associados à utilização de micobactérias com virulências distintas.

No presente estudo foi avaliado, pela primeira vez, de forma comparativa, a biogênese dos compartimentos fagossomais induzidos por variantes de micobactérias da mesma cepa, mas com virulências distintas, no tempo de 24 horas. A lise das células infectadas, nesse tempo, mostrou que ambas as variantes de micobactérias eram igualmente viáveis.

Aumento de fusão com lisossomas foi, anteriormente, observado em compartimentos contendo micobactérias mortas. CLEMENS & HORWITZ (1995) demonstraram que fagossomas induzidos por micobactérias vivas restringem a fusão com lisossomas (20% de fusão), enquanto que fagossomas induzidos por micobactérias mortas pelo calor fusionam com lisossomas (70% de fusão). Da mesma forma, BARKER et al. (1997), utilizando macrófagos murinos da linhagem RAW infectados por *M. marinum*, demonstraram que a maioria dos bacilos viáveis se encontrava em compartimentos com características de endossomas primários, enquanto que os organismos mortos pelo calor foram localizados em vacúolos com características de endossomas tardios e lisossomas.

Neste trabalho foi demonstrado que a relação do percentual de fusão de fagossomas induzidos por micobactéria avirulenta com lisossomas, em comparação ao observado com micobactéria virulenta, foi reprodutivamente superior, variando de 39,0 a 64,0%, com uma média de 51,8%. Entretanto, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa devido, provavelmente, à variabilidade dos experimentos. A constituição diferenciada da camada externa da parede bacteriana das duas variantes pode estar determinando destinos intracelulares diferentes, através da interação de seus ligantes com receptores distintos da célula hospedeira (MALIK et al., 2000).

Nós demonstramos que o tratamento por IFN- γ levou a um aumento discreto da fusão de fagossomas induzidos pela variante virulenta. Porém, essa diferença observada não apresentou significância estatística.

Nossos resultados são consistentes com os de SCHAIBLE et al. (1998) que, utilizando macrófagos murinos infectados por *M. avium* virulenta, demonstraram que nos grupos tratados com 400 UI/ml de IFN- γ e 500 ng/ml de LPS, cinco dias após a infecção, os fagossomas apresentavam marcadores de membrana lisossomais e os bacilos virulentos, sinais ao microscópio eletrônico sugestivos de perda da viabilidade. Mais recentemente, foi demonstrado que o tratamento de células J774 com 500 UI/ml de IFN- γ e 1 μ M de LPS infectadas por *M. bovis* BCG promoveu a acidificação e maturação dos fagossomas a fagolisossomas (VIA et al., 1998). Em contraste, CLEMENS & HORWITZ (1995), utilizando macrófagos humanos infectados por *M. tuberculosis* virulenta, não observaram alteração no percentual de fusão de fagossomas com lisossomas pelo tratamento com 50 UI/ml de IFN- γ , adicionado antes ou após a fagocitose.

É possível que as diferenças entre esses resultados estejam relacionadas com a espécie de micobactéria e o tipo celular utilizado. Macrófagos murinos diferem dos humanos em vários aspectos, inclusive quanto à capacidade de produzir NO, quando estimulados por citocinas. Além do mais, foram utilizadas diferentes concentrações de IFN- γ e/ou a associação com outras substâncias, como LPS. É possível que o disparo do segundo sinal seja necessário para aumentar a fusão induzida pelo IFN- γ .

O discreto aumento do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas, por nós observado, nos grupos infectados por micobactérias virulentas tratados por IFN- γ , parece estar relacionado com a produção de NO pelas células J774, pois a adição de AMG nas culturas pré-tratadas com IFN- γ levou à diminuição do percentual de fusão de fagossomas com lisossomas. Além do mais, em resultados preliminares, observamos que, no tempo de 24 horas, em células infectadas por micobactéria virulenta e tratadas por SNAP houve produção elevada de NO e perda da viabilidade de micobactérias. Essa perda da viabilidade foi acompanhada de aumento do percentual

de fusão de fagossomas com lisossomas de 63,7% em relação ao controle e 45,1% em relação ao grupo tratado com IFN- γ .

Até o momento, os estudos realizados sobre o efeito de citocinas sobre a biogênese dos compartimentos induzidos por micobactérias não definiram qual dos eventos ocorre primeiro, se a morte do bacilo ou a diferenciação dos fagossomas induzidos por micobactérias, em fagolisossomas (SCHAIBLE et al, 1998; VIA et al, 1998).

Em nossa opinião, a fusão com os lisossomas é um evento que ocorre antes da perda da viabilidade das micobactérias, pois, apesar de nossos resultados não serem conclusivos, em células infectadas por micobactérias virulentas tratadas com IFN- γ , no tempo de 24 horas após a infecção, foi possível detectar aumento da formação de fagolisossomas, sem perda da viabilidade dos bacilos. A realização de experimentos com tempos mais longos de infecção podem ser mais esclarecedores.

É possível que o NO exerça outro efeito na célula infectada, além da destruição das micobactérias. Ele pode estar agindo na indução da fusão de fagossomas micobacterianos com lisossomas da célula hospedeira, através da reação de oxi-redução de moléculas que controlam a fusão de membranas, como por exemplo, as pequenas proteínas G da família Rab. Foi demonstrado que, dessa maneira, o NO pode induzir a ativação de Ras, uma pequena proteína G de outra subfamília (LANDER et al, 1995).

A diferenciação dos fagossomas induzidos por micobactérias em lisossomas ácidos e hidroliticamente competentes pode alterar não somente o meio ambiente, como também cofatores capazes de potencializar a eficácia do NO em destruir os bacilos. A oxidação de NO a nitrito e nitrato pode ser retardada em pH ácido. Sabe-se que NO livre pode se combinar com peróxido de hidrogênio, cuja produção é aumentada em macrófagos ativados, para produzir peroxinitrito. NO pode também liberar íons metálicos, como Fe⁺² de metaloproteínas, os quais podem se combinar com peróxido de hidrogênio para produzir íon hidroxila e ferro hipervalente, moléculas tóxicas que podem agir

destruindo o bacilo. Além do mais, a atividade de hidrolases lisossomais na parede celular da micobactéria provavelmente expõe mais alvos ao ataque oxidativo (O'BRIEN & ANDREW, 1996).

7. CONCLUSÃO

7.1 A virulência de *M. intracellulare* está correlacionados com a produção de NO e a fusão de fagossomas com lisossomas.

7.2 NO participa na destruição intracelular de bacilos do complexo MAC.

7.3. NO favorece a fusão dos fagossomas formados por micobacterias do complexo MAC com lisossomas da célula hospedeira.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APPELBERG, R.; CASTRO, AG.; PEDROSA, J.; SILVA, R.A.; ORME, I.; M.; MINOPRIO, P. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. **Infect. Immun.**, **63**:3962-71, 1994.
2. APPELBERG, R. & ORME, I.M. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. **Immunology**, **80**:352-9, 1993.
3. APPELBERG, R. & SARMENTO, A.M. The role of macrophage activation and of Bcg-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, **80**:324-31, 1990.
4. ARMSTRONG, J.A & HART, P.D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. **J. Exp. Med.**, **134**:713, 1971.
5. ARMSTRONG, J.A. & HART, P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J. Exp. Med.**, **142**:1-16, 1975.

6. ASTON, C.; ROM, W.N.; TALBOT, A.T.; REIBMAN, J. Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. **Am. J. Res. Crit. Care.**, **157**:1943-50, 1998.
7. BARKER, L.P.; GEORGE, K.M.; FALKOW, S.; SMALL, P.L. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. **Infect. Immun.**, **65**:1497-504, 1997.
8. BENSON, C.; KERNS E.; SHA B.; GLICK, E.; HARRIS, A; KESSLER, H. Relationship of respiratory and GI tract colonization with *Mycobacterium avium* complex (MAC) to disseminated MAC disease in HIV infected (+) patients. **Program Abstr. 6th Int. Conf. AIDS**, 514, 1990.
9. BERMUDEZ, L.E. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. **Clin Exp. Immunol.**, **91**:277-81, 1993.
10. BERMUDEZ, L.E. Immunobiology of *Mycobacterium avium* infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.** , **13**:1000-6. 1994.
11. BERMUDEZ, L.E. Production of transforming growth factor-beta by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN-gamma. **J. Immunol.**, **150**:1838-45, 1993.

12. BERMUDEZ, L. E.; PETROFSKY, M.; KOLONOSKI, P.; YOUNG, L. S. An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. **J. Inf. Dis.**, **165**:75-9, 1992.
13. BERMUDEZ, L. E.; STEVENS, P.; KOLONOSKI, P.; WU, M.; YOUNG, L. S. Treatment of experimental disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant IL-2 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, **143**:2996-3000, 1989.
14. BERMUDEZ, L.E. & YOUNG, L.S. Killing of *Mycobacterium avium*: insights provided by the use of recombinant cytokines. **Research Microbiol.**, **141**:241-3, 1990.
15. BERMUDEZ, L.E. & YOUNG, L.S. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. **Microbial Pathogenesis**, **7**:289-98, 1989.
16. BLACK, C.M.; BERMUDEZ, L.E.; YOUNG, L.S.; REMINGTON, J.S. Co-infection of macrophages modulates interferon gamma and tumor necrosis factor-induced activation against intracellular pathogens. **J. Exp. Med.**, **172**:977-80, 1990.
17. BLANCHARD, D.K.; MICHELINI-NORRIS, M B.; PEARSON, C.A.; FREITAG, C. S.; DJEU, J.Y. *Mycobacterium avium-intracellulare* induces interleukin-6 from human monocytes and large granular lymphocytes. **Blood**, **77**:2218-24, 1991.
18. BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, **174**:1549-55, 1991.

19. BONECINI-ALMEIDA, M.G.; CHITALE, S.; BOUTSIKAKIS, I.; GENG, J.; DOO, H.; HE, S.; HO, J.L. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. **J. Immunol.**, **160**:4490-9, 1998.

20. BRADLEY, D.J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. **Clin. Exp. Immunol.**, **30**:130-40, 1977.

21. BRENNAN, P.J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. **J. Biol. Chem.**, **11 Suppl 2**:S420-30, 1989.

22. CASCIOLA-ROSEN, L.A. & HUBBARD, A.L. Lumenal labeling of rat hepatocyte early endosomes. Presence of multiple membrane receptors and the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. **J. Biol. Chem.**, **267**:8213-21, 1992.

23. CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN, J.; BLOOM, B.R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, **63**:736-40, 1995.

24. CHESTER, A.C. & WINN, W.C.JR. Unusual and newly recognized patterns of nontuberculous mycobacteria infection with emphasis on the immunocompromised host. **Pathol. Annu.** **21**:251-64, 1986.

25. CLEMENS, D.L. & HORWITZ, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, **181**:257-70, 1995.
26. CLEMENS, D.L. & HORWITZ, M.A. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. **J. Exp. Med.**, **184**:1349-55, 1996.
27. COLOMBO, M.I.; MAYORGA, L.S.; CASEY, P.J.; STAHL, P.D. Evidence of a role for heterotrimeric GTP-binding proteins in endosome fusion. **Science**, **255**:1695-97, 1992.
28. COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G.; ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, **178**: 2243-47, 1993.
29. COOPER, A.M.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; ORME, I.M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. **J. Exp. Med.**, **186**:39-45, 1997.
30. CROWLE, A.J.; DAHL, R.; ROSS, E.; MAY, M.H. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. **Infect. Immun.**, **59**:1823-31, 1991.

31. CROWLE, A.J.; TSANG, A.Y.; VATTER, A.E.; MAY, M.H. Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. **J. Clin Microbiol.**, **24**:812-21, 1986.
32. de CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; OFFREDO, C.; SKAMENE, E. Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. **Infect. Immun.**, **61**:3775-84, 1993.
33. DENIS, M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. **J. Leukocyte Biol.**, **49**:380-7, 1991.
34. DENIS, M. & GREGG, E.O. Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. **Immunology**, **71**:139-41, 1990.
35. DEORA, A A; LANDER, H.M.; WIN, T.; VANHAESEBROECK, B.A redox-triggered Ras-effector interaction. **J. Biol. Chem.** **45**:29923-928, 1998.
36. DESJARDINS, M.; HUBER, L.A.; PARTON, R.G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **J. Cell. Biol.**, **124**:677-88, 1994.

37. DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**:2407-12, 1988.
38. DOHERTY, T.M. & SHER, A. Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. **J. Immunol.**, **158**:4822-31. 1997.
39. DOWNING, J.F.; PASULA, R.; WRIGHT, J.R.; TWIGG, H.L.D.; MARTIN, W.J.D. Surfactant protein A promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**:4848-52, 1995.
40. ELLNER, J.J.; GOLDBERGER, M.J.; PARENTI, D.M. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution . **J. Infect. Dis.**, **163**:1326-35, 1991.
41. FERRARI, G.; LANGEN, H.; NAITO, M.; PIETERS, J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. **Cell**, **97**:435-47, 1999.
42. FLESCH, I. & KAUFMANN, S.H. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, **138**:4408-13, 1987.
43. FLESCH, I.E.; HESS, J.H.; OSWALD, I.P.; KAUFMANN, S.H. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. **Int. Immunol.**, **6**:693-700, 1994.

44. FLESCH, I.E. & KAUFMANN, S.H. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. **Infect. Immun.**, **59**:3213-18, 1991.
45. FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C.J.; SCHREIBER, R.; MAK, T.W.; BLOOM, B.R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, **2**:561-72, 1995.
46. FREHEL, C.; de CHASTELLIER, C.; LANG, T.; RASTOGI, N. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, **52**:252-62, 1986.
47. FREHEL, C.; DE CHASTELLIER, C.; OFFREDO, C.; BERCHE, P. Intramacrophage growth of *Mycobacterium avium* during infection of mice. **Infect. Immun.**, **59**:2207-14, 1991.
48. FREHEL, C.; OFFREDO, C.; de CHASTELLIER, C. The phagosomal environment protects virulent *Mycobacterium avium* from killing and destruction by clarithromycin. **Infect. Immun.**, **65**:2792-802, 1997.
49. FREHEL, C. & RASTOGI, N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. **Infect. Immun.**, **55**:2916-21, 1987.
50. FUCHS, R.; SCHMID, S.; MELLMAN, I. A possible role for Na⁺,K⁺-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**:539-43, 1989.

51. FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **J. Biol. Chem.**, **266**:21327-30, 1991.
52. GOLDENTHAL, K.L.; HEDMAN, K.; CHEN, J.W.; AUGUST, J.T.; VIHKO, P.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M.C. Pre-lysosomal divergence of alpha 2-macroglobulin and transferrin: a kinetic study using a monoclonal antibody against a lysosomal membrane glycoprotein (LAMP-1). **J. Histochem.Cytoch.**, **36**:391-400, 1988.
53. GOMES, M.S.; FLORIDO, M.; PAIS, T.F.; APPELBERG, R. Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the inducible nitric oxide synthase gene. **J. Immunol.**, **162**:6734-39, 1999.
54. GRAY, J.R. & RABENECK, L. Atypical mycobacterial infection of the gastrointestinal tract in AIDS patients. **Am J. Gastroenterol.**, **84**:1521-4, 1989.
55. GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. **J. Immunol.**, **127**:2417-21, 1981.
56. GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **J. Exp. Med.**, **185**:717-30, 1997.

57. HACKAM D.J.; ROTSTEIN, OD.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J. Exp. Med.** **188**:351-64, 1998.
58. HOLSTI, M. & ALLEN, P.M. Processing and presentation of an antigen of *Mycobacterium avium* require access to an acidified compartment with active proteases. **Infect. Immunity.**, **64**:4091-98, 1996.
59. HORSBURGH, C.R.J. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **New Engl. J. Med.**, **324**:1332-8, 1991.
60. HORSBURGH, C.R.J. & SELIK, R.M. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Am. Rev. Res. Dis.**, **139**:4-7, 1989.
61. ISEMAN, M D.; CORPE, R.F.; O'BRIEN, R.J.; ROSENZWIEG, D.Y.; WOLINSKY, E. Disease due to *Mycobacterium avium-intracellulare*. **Chest**, **87**:139S-149S, 1985.
62. JACOBSON, M.A.; HOPEWELL, P.C.; YAJKO, D.M.; HADLEY, W.K.; LAZARUS, E.; MOHANTY, P.K.; MODIN, G.W.; FEIGAL, D.W.; CUSICK, P.S.; SANDE, M.A. Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **J. Infect. Dis.**, **164**:994-8, 1991.
63. JONES, S.L.; LINDBERG, F.P.; BROWN, E.J.; PAUL, W. Phagocytosis. In: Paul, W., Ed. *Fundamental immunology*. 4 ed. Philadelphia; Bippincott-Raven, p.997-1020, 1999.

64. KAMIJO, R.; HARADA, H.; MATSUYAMA, T.; BOSLAND, M.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; LE, J.; KOH, S.I.; KIMURA, T.; GREEN, S.J.; AL, E. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, **263**:1612-15, 1994.
65. KINDLER, V. & SAPPINO, A.P. The beneficial effects of localized tumor necrosis factor production in BCG infection. **Behing Inst. M.**, 120-24, 1991.
66. KINDLER, V.; SAPPINO, A.P.; GRAU, G.E.; PIGUET, P.F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, **56**:731-40, 1989.
67. KOLB, H. & KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol. Today**, **13**:157-60, 1992.
68. KORNFELD, S & MELLMAN, I. The biogenesis of lysosomes. **Ann. Rev. Cell Biol.**, **5**:483-525, 1989.
69. KRUYIS, V.; KEMMER, K.; SHAKHOV, A.; JONGENEEL, V.; BEUTLER, B. Constitutive activity of the tumor necrosis factor promoter is canceled by the 3' untranslated region in nonmacrophage cell lines; a trans-dominant factor overcomes this suppressive effect. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:673-7, 1992.

70. KWAN W. C.; McMASTER W.R.; WONG N; REINER N.E. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. **Infect. Immun.** 60:2115-2120, 1992.
71. LOCKSLEY, R.M. & SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol. Today**, 12:A58-61, 1991.
72. LODISH, H., BERK, A, ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. Protein Sorting: organelle biogenesis and protein secretion. In: **Molecular cell biology**. 4 ed. W.H. Freeman and Co, 2000, New York: Cap.17, p. 675-750.
73. MacMICKING, J.D.; NORTH, R.J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J.S.; SHAH, S.K.; NATHAN, C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94:5243-48, 1997.
74. MALIK, Z.A; DINNING, G.M.; KUSNER, D. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. **J. Exp. Med.** 2: 287-302, 2000.
75. MALO, D.; VOGAN, K.; VIDAL, S.; HU, J.; CELLIER, M.; SCHURR, E.; FUKS, A.; BUMSTEAD, N.; MORGAN, K.; GROS, P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. **Genomics**, 23:51-61, 1994.

76. MARTIN, E.; NATHAN, C.; XIE, Q. W. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.** **180**:977-84, 1994.
77. MARTH, T. & KELSALL, B.L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. **J. Exp. med.**, **185**:1987-95, 1997.
78. MAXFIELD, F.R. & YAMASHIRO, D.J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. **Adv.Exp. Med. Biol.**, **225**:189-98, 1987.
79. MAYORGA, L.S.; DIAZ, R.; COLOMBO, M.I.; STAHL, P.D. GTP gamma S stimulation of endosome fusion suggests a role for a GTP-binding protein in the priming of vesicles before fusion. **Cell Regul.**, **1**:113-24, 1989.
80. MCDONOUGH, K.A.; KRESS, Y.; BLOOM, B.R. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. **Infect. Immun.**, **61**:2763-73, 1993.
81. MEDINA, E. & NORTH, R.J. Resistance ranking of some common inbred strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. **Immunology**, **93**: 270-274, 1998.
82. MOLLOY, A.; GAUDERNACK, G.; LEVIS, W.R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Suppression of T-cell proliferation by *Mycobacterium leprae* and its products: the role of lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:973-7, 1990.

83. MORENO, C.; TAVERNE, J.; MEHLERT, A.; BATE, C. A.; BREALEY, R. J.; MEAGER, A.; ROOK, G.A.; PLAYFAIR, J.H. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, **76**:240-45, 1989.
84. MURRAY, P. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends Microbiol.**, **7**:366-71, 1999.
85. MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D.S.; FROLAND, S.S.; SONG, Y.K. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, **14**:541-53, 1973.
86. NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb Journal**, **6**:3051-64, 1992.
87. NORTH, R.J.; LACOURSE, R.; RYAN, L.; GROS, P. Consequence of Nramp1 deletion to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Infect. Immun.**, **67**:5811-4, 1999.
88. O'BRIEN, L.; ROBERTO, B.; ANDREW, P.W. In vitro interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages: activation of anti-mycobacterial activity of macrophages and mechanisms of anti-mycobacterial activity. **Curr. Trop. Microbiol. Immunol.**, **215**: 97-130, 1996.

89. OH, Y.K. & STRAUBINGER, R.M. 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. **Inf. Immun.**, **64**:319-25, 1996.
90. PANCHOLI, P.; MIRZA, A.; BHARDWAJ, N.; STEINMAN, R.M. Sequestration from immune CD4+ T cells of mycobacteria growing in human macrophages. **Science**, **260**:984-86, 1993.
91. PITT, A.; MAYORGA, L.S.; STAHL, P.D.; SCHWARTZ, A.L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. **J. Clin Inv.**, **90**:1978-83, 1992.
92. PLANT, J. & GLYNN, A A. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **J. Infect. Dis.**, **133**:72-8, 1976.
93. PRINCE, D.S.; PETERSON, D.D.; STEINER, R.M.; GOTTLIEB, J.E.; SCOTT, R.; ISRAEL, H.L.; FIGUEROA, W.G.; FISH, J.E. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. **New. Engl. J. Med.**, **321**:863-68, 1989.
94. PRINZIS, S.; RIVOIRE, B.; BRENNAN, P.J. Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.** **62**: 1946-51, 1994.
95. RASTOGI, N.; FREHEL, C.; RYTER, A; OHAYON, A; LESOURD, M.; DAVID, H.L. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for exclusion of antimicrobial agents? **Antimicrobial Agents Chemothe.**, **20**:666-77, 1981.

96. ROOK, G.A.; STEELE, J.; AINSWORTH, M.; CHAMPION, B.R. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. **Immunology**, **59**:333-38, 1986.
97. ROTHMAN, J.E. & SOLLNER, T.H. Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion. **Science**, **276**:1212-13, 1997.
98. RUNYON, E. H. Ten mycobacterial pathogens. **Tubercle**, **55**:235-40, 1974.
99. RUSSELL, D.G.; DANT, J.; STURGILL-KOSZYCKI, S. *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**:4764-73, 1996.
100. RUSSELL, D.G. What does "inhibition of phagosome-lysosome fusion" really mean? **Trends in Microbiol.**, **6**:212-14, 1998.
101. SAITO, H.H.; TOMIOKA, K.; SATO, H.; TASAKA, D.J.; DAWSON. Identification of various serovars of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:1694-97, 1990.
102. SARMENTO, A. & APPELBERG, R. Involvement of reactive oxygen intermediates in tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, **64**:3224-30, 1996.

103. SATO, K.; AKAKI, T.; TOMIOKA, H. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). **Clin. Exp. Immunol.**, **112**:63-8, 1998.
104. SCHAEFER, W.B. Serological identification of atypical mycobacteria. In. T. BERGAN; J.R.NORRIS ed. **Methods in Microbiol.**, p.323-44, 1979.
105. SCHAEFER, W.B.; DAVIS, C.L.; COHN, M.L. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **102**:499-506, 1970.
106. SCHAIBLE, U.E.; STURGILL-KOSZYCKIE, S.; SCHLESINGER, P.H.; RUSSELL, D.G. Cytokine activation leads to acidification and increase maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosome in murine macrophages. **J. Immunol.**, **160**: 1290-96, 1998.
107. SCHLESINGER, L.S. *Mycobacterium tuberculosis* and the complement system. **Trends Microbiol.**, **6**:47-9; discussion 49-50, 1998.
108. SCHLESINGER, L.S.; BELLINGER-KAWAHARA, C.G.; PAYNE, N.R.; HORWITZ, M.A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **J. Immunol.**, **144**:2771-80, 1990.

109. SCHWEIZER, A.; KORNFIELD, S.; ROHRER, J. Cysteine³⁴ of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.**, **132**:577-84, 1996.
110. SHIRATSUCHI, H.; JOHNSON, J.L.; ELLNER, J.J. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. **J. Immun.**, **146**:3165-70, 1991.
111. SIBLEY, L.D.; FRANZBLAU, S.G.; KRAHENBUHL, J.L. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, **55**:680-85, 1987.
112. SKAMENE, E.; GROS, P.; FORGET, A.; PATEL, P.J.; NESBITT, M.N. Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in the mouse. **J. Clin. Microbiol.**, **19**:117-24, 1984.
113. SMITH, L.E.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D.G. The interaction between CD8⁺ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. **J. Exp. Med.**, **174**:499-505, 1991.
114. STORMER, R.S. & FALKINHAM, J.O.D. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. **J. Clin. Microbiol.** **27**:2459-65, 1989.
115. STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHAIBLE, U.E.; RUSSELL, D.G. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. **EMBO J.**, **15**:6960-68, 1996.

116. STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P.H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.L.; COLLINS, H.L.; FOK, A. K.; ALLEN, R.D.; GLUCK, S.L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, **263**:678-81, 1994.
117. SUTTERWALA, F.S.; NOEL, G. J.; CLYNES, R.; MOSSER, D.M. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. **J. Exp. Med.**, **185**:1977-85, 1997.
118. THOREL, M.F. & DAVID, H.L. Specific surface antigens of SmT variants of *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, **43**:438-9, 1984.
119. VANHEYNINGEN, T.K.; COLLINS, H.L.; RUSSELL, D.G. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. **J. Immunol.**, **158**:330-37, 1997.
120. VIA, L.E.; DERETIC, D.; ULMER, R.J.; HIBLER, N.S.; HUBER, L.A.; DERETIC, V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. **J. Biol. Chem.**, **272**:13326-31, 1997.
121. VIA, L.E.; FRATTI, R.A.; McFALONE, M.; PAGÁN-RAMOS, E.; DERETIC, D; DERETIC, V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. **J. Cell. Sci.** **111**: 897-905, 1998.
122. VIDAL, S.M.; PINNER, E.; LEPAGE, P.; GAUTHIER, S.; GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. **J. Immunol.**, **157**:3559-68, 1996.

123. WAKEHAM, J.; WANG, J.; MAGRAM, J.; CROITORU, K.; HARKNESS, R.; DUNN, P.; ZGANIACZ, A.; XING, Z. Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice. **J. Immunol.**, **160**:6101-11, 1998.
124. WAYNE, L.G. & SRAMEK, H.A. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, **5**:1-25, 1992.
125. WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Microbiol. Serol.**, **15**:1141-207, 1984.
126. WOODLEY, C.L. & DAVID, H.L. Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemoth.**, **9**:113-9, 1976.
127. WRIGHT, S.D. & SILVERSTEIN, S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med.**, **158**:2016-23, 1983.
128. XU, S.; COOPER, A.; STURGILL-KOSZYCKI, S.; VAN HEYNINGEN, T.; CHATTERJEE, D.; ORME, I.; ALLEN, P.; RUSSELL, D. G. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. **J. Immunol.**, **153**:2568-78, 1994.
129. YOSHIMURA, H.H. & GRAHAM D.Y. Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, **26**:1309-12, 1988.

130. YOUNG, L.S.; INDERLIED, C.B.; BERLIN, O.G.; GOTTLIEB, M.S. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. **Rev. Infect. Dis.**, **8**:1024-33, 1986.