



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INTERFERON- $\gamma$  NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DURANTE A  
INFECCÃO PELO *Mycobacterium bovis***

**TONYA AZEVEDO DUARTE**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2002**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INTERFERON- $\gamma$  NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DURANTE A  
INFECÇÃO PELO *Mycobacterium bovis***

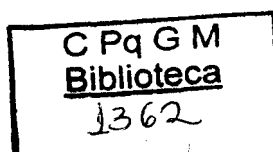
Tonya Azevedo Duarte

Orientador: Dr. Sérgio Arruda

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

**Salvador - Bahia**

**2002**



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

Duarte, Tonya Azevedo  
D812a Avaliação do papel do interferon- $\gamma$  na modulação da  
resposta tecidual contra o *Mycobacterium bovis* / Tonya  
Azevedo Duarte. \_Salvador: Universidade Federal da Bahia /  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2002.  
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) –  
Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz, 2002.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Tuberculose. 3. Interferon- $\gamma$ .  
I. Título.

CDU 616.982.2:577.27

211 D812a

616.982.2:577.27

D812 a

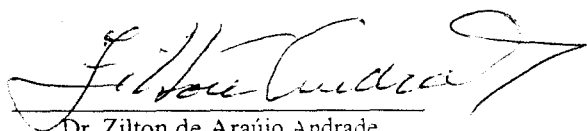
PEL  
UFV 4362

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INTERFERON-GAMA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL  
CONTRA O *Mycobacterium bovis*

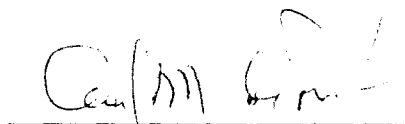
TONYA AZEVEDO DUARTE

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Zilton de Araújo Andrade  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Luiz A. R. de Freitas  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Sérgio Arruda  
Pesquisador Adjunto  
CPqGM / FIOCRUZ

A todos que direta ou indiretamente estão envolvidos e me apoiam nessa luta constante, sobretudo a minha família.

## AGRADECIMENTOS

---

**A Deus**, minha força maior.

**Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Sérgio Arruda** pela orientação deste trabalho.

**Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Manoel Barral-Netto** pelo incentivo e apoio.

**Ao Prof<sup>o</sup>. Luciano E. Fonseca e ao mestrando Almério Noronha** pela ajuda na análise histopatológica.

**Ao Dr. Mitermayer G. Reis**, Diretor do CPqGM, pelas condições da infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

**Aos Drs. Manoei Barrai Neto e Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**, Coordenadores do Mestrado e Doutorado em Patologia FIOCRUZ-UFBA, pela competência na condução deste curso.

**Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Patologia** que, seguramente, contribuíram nessa escalada.

**Aos colegas do LIMi (Laboratório de Imuno-regulação e Microbiologia) e colegas do mestrado** pelo auxílio constante.

**A Comunicação Visual e Documentação Científica** pelo apoio na elaboração dos recursos visuais e digitalização de imagens.

**A todos da Biblioteca** pelo auxílio na aquisição dos artigos e bibliografias e a Bibliotecária **Ana Fiscina** pela revisão das referências bibliográficas.

**Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP)** pela doação dos camundongos deficientes de IFN-gamma.

**Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do INCQS** pelo fornecimento da cepa *Mycobacterium bovis* (ATCC 19.274)

**Aos meus grandes amigos** pelo companherismo, solidariedade e aconchego nas horas certas e incertas.

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Características e Classificação do <i>Mycobacterium bovis</i> .....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 Epidemiologia .....</b>	<b>01</b>
<b>1.3 Patologia .....</b>	<b>04</b>
<b>1.4 Resposta Imune à Micobactéria .....</b>	<b>07</b>
<b>1.5 Papel do INF-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>

**SUMÁRIO**

---

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Características e Classificação do <i>Mycobacterium bovis</i> .....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 Epidemiologia .....</b>	<b>01</b>
<b>1.3 Patologia .....</b>	<b>04</b>
<b>1.4 Resposta Imune à Micobactéria .....</b>	<b>07</b>
<b>1.5 Papel do INF-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>



	v
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Animal Experimental .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Preparação do Inóculo .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Infecção Experimental .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4 Quantificação de Carga Bacilar .....</b>	<b>20</b>
<b>4.5 Histopatologia .....</b>	<b>21</b>
<b>4.6 Morfometria .....</b>	<b>22</b>
<b>4.7 Análise Estatística .....</b>	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Curva Ponderal .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Carga Micobacteriana .....</b>	<b>25</b>
<b>5.3 Avaliação Histopatológica .....</b>	<b>29</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

- AIDS ⇒ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BAAR ⇒ Bacilo Álcool Ácido Resistente
- BCG ⇒ Bacilo Calmette-Guérin
- CFU ⇒ Unidades formadoras de colônias
- CPH ⇒ Complexo de Histocompatibilidade Principal
- GM-CSF ⇒ Fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos
- HIV ⇒ Vírus da imunodeficiência humana
- IBGE ⇒ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IFN- $\gamma$  ⇒ Interferon gama
- IL ⇒ Interleucina
- MCP ⇒ Proteína de quimiotaxia de macrófagos
- MHC ⇒ Complexo de histocompatibilidade principal
- MIP ⇒ Proteína inflamatória de macrófagos
- NK ⇒ Células assassinas naturais
- NO ⇒ Óxido Nítrico
- OMS ⇒ Organização Mundial de Saúde
- RNAm ⇒ Ácido ribonucléico mensageiro
- SDA ⇒ Secretaria de Defesa Agropecuária
- TGF- $\beta$  ⇒ Fator transformador de crescimento beta
- Th ⇒ Células T auxiliaadoras
- TNF- $\alpha$  ⇒ Fator de necrose tumoral alfa

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1: Curva Ponderal de Camundongos IFN-<math>\gamma</math><sup>-/-</sup> e IFN-<math>\gamma</math><sup>+/+</sup> .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 2: Carga Bacilar no Fígado e Pulmões de IFN-<math>\gamma</math><sup>-/-</sup> e IFN-<math>\gamma</math><sup>+/+</sup> .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3: Alterações Histopatológicas .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 4: Alterações Histopatológicas .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 5: Alterações Histopatológicas .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6: Densidade Numérica dos Granulomas Hepáticos .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7: Área dos Granulomas Hepáticos .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 8: Percentual da Área Ocupada pelos Granulomas Hepáticos .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 9: Densidade Numérica dos Granulomas Hepáticos .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 10: Área dos Granulomas Pulmonares .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 11: Percentual da Área Ocupada pelos Granulomas Pulmonares .....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela 1: Quantificação de CFU em Secções de Fígado .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 2: Quantificação de CFU em Secções de Pulmão .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 3: Dados Morfométricos dos Granulomas Hepáticos .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 4: Dados Morfométricos dos Granulomas Pulmonares .....</b>	<b>46</b>

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INTERFERON- $\gamma$  NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL CONTRA O *Mycobacterium bovis*. TONYA AZEVEDO DUARTE.** O IFN- $\gamma$  tem sido implicado na defesa do hospedeiro contra as micobactérias. Esta citocina, produzida e liberada por linfócitos T recrutados para o sítio da infecção, é considerada o agente chave da ativação endógena, promovendo efeitos antimicobacterianos de macrófagos. Diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para delinear o papel de citocinas responsáveis pelo controle da tuberculose. O presente estudo visa delinear o papel do IFN- $\gamma$  na modulação da resposta inflamatória granulomatosa no tecido hepático e pulmonar em camundongos infectados experimentalmente com o *M. bovis*. Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos com deficiência do gene responsável pela produção do IFN- $\gamma$  (C57BL/6 IFN- $\gamma^{-/-}$ ) e camundongos que produzem IFN- $\gamma$  (C57BL/6 IFN- $\gamma^{+/+}$ ), ambos infectados por via intravenosa com *M. bovis*. Avaliou-se a capacidade de sobrevivência e multiplicação do *M. bovis* no fígado e pulmões, assim como características histopatológicas nestes dois órgãos. No curso da infecção (15, 30, 50 e 100 dias pós-infecção) a CFU (unidade formadora de colônia) foi quantificada no tecido hepático e pulmonar dos dois grupos de camundongos. A carga bacilar dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$  foi significativamente maior que nos IFN- $\gamma^{+/+}$ . A quantidade de CFU foi maior no fígado que nos pulmões dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$  durante todo o estudo, enquanto nos IFN- $\gamma^{+/+}$  apenas no primeiro ponto estudado (15 dias pós-infecção). Adicionalmente, nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  ocorreu um aumento contínuo da carga bacilar com o transcurso da infecção, enquanto os camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$  foram capazes de reduzir a carga bacilar no tecido hepático nos períodos mais tardios da análise. As alterações histopatológicas começam mais tardiamente nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  (30 dias de pós-infecção). Estes formam granulomas sempre em menor número e tamanho que os IFN- $\gamma^{+/+}$ . As alterações granulomatosas no fígado persistem até os 100 dias no camundongo IFN- $\gamma^{-/-}$  e diminuem nos IFN- $\gamma^{+/+}$ . Portanto, a presença do IFN- $\gamma$  influenciou no sobrevivência e multiplicação do *M. bovis* no fígado e pulmões dos camundongos, assim como na formação e resolução do processo granulomatoso.

**ABSTRACT**

**EVALUATION OF ROLE OF THE INTERFERON- $\gamma$  IN MODULATION OF RECIDIVAL RESPONSE AGAINST *Mycobacterium bovis*. TONYA AZEVEDO DUARTE.** IFN- $\gamma$  has been largely implicated in the host defense against mycobacteria. This cytokine, produced and released by T lymphocytes recruited to the site of infection, is considered the key agent of endogenous activation, promoting antimicrobial effects on macrophages. Diverse experimental models have been developed to delineate the role of cytokines responsible for the control of tuberculosis. The present study aims to evaluate the role of IFN- $\gamma$  in the immune granulomatous response against *M. bovis* in liver and lung tissue. The experiment utilized C57BL/6 mice lacking the genes for synthesis of IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) and their wild-type counterparts (IFN- $\gamma^{+/+}$ ), that were intravenously infected with *M. bovis*. The ability of *M. bovis* to survive and reproduce in the liver and lungs was evaluated, as well as characterized histopathologically in these two organs. In the course of infection (15, 30, 50, and 100 days post-infection), bacillary load (number of colony forming units) in the liver and lungs was quantified in the two groups of mice. Bacillary load was greater in both organs in the animals that were IFN- $\gamma^{-/-}$  than in mice that were IFN- $\gamma^{+/+}$ . Bacillary load was greater in the liver than in the lungs of IFN- $\gamma^{-/-}$  mice, during the entire study period, while in controls this was true only at the first time-point (15 days post-infection). Bacillary load increased progressively in the two organs of the IFN- $\gamma^{-/-}$  mice, whereas wildtype animals were of controlling bacillary growth. The granulomas were observed in the IFN- $\gamma^{-/-}$  mice after 30 days of infection, and earlier in controls. Granulomatous changes in the liver persisted in the IFN- $\gamma^{-/-}$  mice and resolved in the controls, more significantly after 100 days. Additionally, IFN- $\gamma^{-/-}$  mice had fewer and smaller granulomas than IFN- $\gamma^{+/+}$ . The presence of IFN- $\gamma$  influenced the multiplication of *M. bovis* in the liver and lungs of mice, as well as the formation and resolution of granulomatous process.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

---

## 1.1. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DO *Mycobacterium bovis*

O *M. bovis*, o agente etiológico da tuberculose bovina, é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), ou seja, quando corado pela fucsina a quente, não se descola pelo álcool ácido clorídrico (coloração de Zielh Neelsen). Pertence à ordem Actinomycetales e ao gênero *Mycobacterium* (Kantor, 1979). As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído pelo *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, este último ainda não isolado no Brasil. O *M. bovis* é um bacilo intracelular facultativo e tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro de células, especialmente macrófagos.

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

O *M. bovis*, o agente causal da tuberculose bovina, tem um grande espectro de hospedeiros. As espécies susceptíveis incluem a bovina, a humana, a caprina, a felina, a canina, a suína, a bubalina e outras espécies de mamíferos selvagens (Morris, 1994).

A tuberculose provavelmente surgiu como uma doença endêmica em animais e posteriormente em seres humanos (Steel and Ranney, 1958). A tuberculose foi reconhecida primeiramente como doença causada por um agente infeccioso em

animais. Historicamente, a transmissibilidade da doença a partir de material humano aos animais (coelho) foi descrita pela primeira vez por Villemin em 1865 (Roxo, 1996). Mas foi Robert Koch que, em 1882, descobriu o agente infeccioso, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura em 1884 (Roxo, 1997). A diferenciação entre o bacilo humano (*M. tuberculosis*), bovino (*M. bovis*) e o aviário (*M. avium*) foi primeiramente descrita nos Estados Unidos por Smith em 1897 (Pritchard, 1988).

A tuberculose ressurgiu hoje como a doença infecciosa mais comum em todo o mundo, acometendo aproximadamente três milhões de mortes a cada ano. O advento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), em muito colaborou para o aumento no número de casos novos a cada ano, principalmente nos países do terceiro mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 4.4 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo *M. tuberculosis* e HIV. Segundo O'Reilly e Daborn (1995), a AIDS aumentou o risco de manifestação da doença em seres humanos, para ambos, *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

A tuberculose bovina era considerada o maior problema em saúde pública por sua transmissão ao homem por meio do leite de vacas infectadas, acometendo principalmente crianças e adolescentes. O desenvolvimento da pasteurização contribuiu para minimizar esse problema. Contudo, em alguns países, ainda persiste o hábito de consumir leite cru ou preparar derivados com leite não fervido.

Segundo a OMS, a tuberculose como zoonose é preocupante, principalmente nos países em desenvolvimento, pelo pouco conhecimento do problema. Assim, é necessária a implementação de programas que visem o avanço da saúde pública



animais. Historicamente, a transmissibilidade da doença a partir de material humano aos animais (coelho) foi descrita pela primeira vez por Villemin em 1865 (Roxo, 1996). Mas foi Robert Koch que, em 1882, descobriu o agente infeccioso, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura em 1884 (Roxo, 1997). A diferenciação entre o bacilo humano (*M. tuberculosis*), bovino (*M. bovis*) e o aviário (*M. avium*) foi primeiramente descrita nos Estados Unidos por Smith em 1897 (Pritchard, 1988).

A tuberculose ressurgiu hoje como a doença infecciosa mais comum em todo o mundo, acometendo aproximadamente três milhões de mortes a cada ano. O advento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), em muito colaborou para o aumento no número de casos novos a cada ano, principalmente nos países do terceiro mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 4.4 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo *M. tuberculosis* e HIV. Segundo O'Reilly e Daborn (1995), a AIDS aumentou o risco de manifestação da doença em seres humanos, para ambos, *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

A tuberculose bovina era considerada o maior problema em saúde pública por sua transmissão ao homem por meio do leite de vacas infectadas, acometendo principalmente crianças e adolescentes. O desenvolvimento da pasteurização contribuiu para minimizar esse problema. Contudo, em alguns países, ainda persiste o hábito de consumir leite cru ou preparar derivados com leite não fervido.

Segundo a OMS, a tuberculose como zoonose é preocupante, principalmente nos países em desenvolvimento, pelo pouco conhecimento do problema. Assim, é necessária a implementação de programas que visem o avanço da saúde pública

veterinária, neste caso, em relação à infecção por *M. bovis*, especialmente nas populações de risco (OMS, Nota Técnica 130, 1993).

Nota-se que são escassos os dados informativos sobre a infecção do *M. bovis* em seres humanos na América Latina. Este fato ocorre devido ao método de eleição para o diagnóstico da tuberculose no homem. Neste universo ele é representado apenas pela baciloscopia do escarro, não realizando o isolamento e a identificação do agente na maioria dos laboratórios da rede de saúde.

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento e em criações intensivas, a exemplo de bovinos leiteiros. A tuberculose bovina concentra-se principalmente na América do Sul, que também detém a maior população bovina mundial (Kleeberg, 1984). O Brasil possui, atualmente, uma população bovina maior que 150 milhões de cabeças. Dados oficiais publicados em 1997 pelo IBGE/SDA (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística / Secretaria de Defesa Agropecuária) estimam que 1,6 milhões de cabeças do rebanho bovino nacional são consideradas positivas ou suspeitas, o que reflete uma prevalência maior que 1% no ano de 1997.

Kleeberg (1984) admite que o homem é tão susceptível ao bacilo bovino quanto ao bacilo humano. A tuberculose humana por *M. bovis* pode ter origem exógena, pelo contágio via aerógena a partir de bovinos tuberculosos, ou via digestiva pela ingestão de leite contaminado. Contudo, pode ocorrer o contágio homem a homem (Grange, 1994). A infecção endógena, por reativação do foco primário, pode ser observada em indivíduos adultos com idade avançada, assim como nos imunodeprimidos.

Quando a infecção ocorre pelo trato respiratório (aerossóis), o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos hilares e mediastinais. Já quando a infecção se dá pela via digestiva, a lesão localiza-se no íleo e ceco e a doença é denominada tuberculose ileal ou íleo-cecal. No entanto, pode atingir todos os órgãos quando ocorre a generalização do processo e neste caso é denominada de tuberculose miliar (Morson & Dawson, 1974).

Em países onde a tuberculose bovina não é controlada, a maioria dos casos de tuberculose humana causada por *M. bovis* ocorre em crianças, resultado da ingestão do leite contaminado. Segundo Grange et al (1994) a tuberculose por *M. bovis* manifestava-se principalmente em crianças, causando escrofulose (linfadenite cervical), tuberculose intestinal ou outras formas da doença extrapulmonar. Após a Segunda Guerra Mundial, este quadro foi modificado pelo controle e erradicação da tuberculose nos bovinos em diversos países e pela pasteurização do leite. Hoje, nos países desenvolvidos, o que se observa são principalmente manifestações da forma pulmonar em adultos e, nas formas extrapulmonares, a infecção do trato genito-urinário, acometendo especialmente habitantes da zona rural (Grange et al, 1994). Collins e Yates (1982), em seis anos de pesquisa, notificaram 137 casos de tuberculose humana por *M. bovis* (2,7% do total de casos de tuberculose) na região sudeste da Inglaterra.

### **1.3. PATOLOGIA**

No tecido do hospedeiro, a lesão mais comumente associada à tuberculose por *M. bovis* é o granuloma. Granuloma é um processo essencialmente inflamatório, sendo caracterizado por inflamação crônica. O granuloma, em cortes histológicos,

apresenta-se como uma infiltração de células. A presença da micobactéria no tecido leva ao recrutamento de células inflamatórias, especialmente macrófagos, para o sítio da infecção iniciando a formação de granulomas. Os granulomas são formados por um acúmulo de macrófagos e células T, onde os mecanismos antimicobacterianos podem ser coordenados e regulados (Kaufmann, 1993). A persistência do bacilo no tecido do hospedeiro, a presença do fator corda (trehalose-6,6'-dimicolato – TDM) na parede da micobactéria (Perez et al, 2000) e outros componentes em estruturas superficiais são responsáveis pela formação de granulomas.

O granuloma da tuberculose tem um padrão distintivo de reação granulomatosa crônica, na qual os tipos celulares predominantes são macrófagos e células epitelióides. Neste tipo de lesão tem-se uma agregação microscópica de células epitelióides na região central. Tal agregação é circundada por um colar de linfócitos. Os granulomas mais antigos podem desenvolver uma orla de fibroblastos e tecido conjuntivo (fibrose). Quando durante o processo inflamatório crônico ocorre morte celular, grande parte dos macrófagos são lisados, levando à necrose caseosa.

A formação de granuloma é uma resposta inflamatória crônica influenciada, mas não dependente de linfócitos (Mariano, 1995). Distintas populações de células T ( $\alpha\beta$  e  $\delta\gamma$ ) foram avaliadas em seu papel na infecção experimental por BCG (Ladel et al, 1995b), utilizando animais deficientes de gens para cada família de células T. Achados deste experimento comprovaram o papel central de células T  $\alpha\beta$  na resposta imune in vitro e in vivo, isto é, na inibição do crescimento micobacteriano nos órgãos infectados, na formação de granulomas e no desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade tardia in vivo, bem como na produção de IFN- $\gamma$

induzida por antígeno in vitro. Além disso, observou-se a função auxiliar dos linfócitos T  $\delta\gamma$  na resposta imune, embora estas células não fossem capazes de compensar eficientemente a deficiência de células T  $\alpha\beta$  na proteção contra o BGC (Ladel et al, 1995b).

A formação de granulomas é essencial para o controle da infecção crônica, prevenindo a disseminação da micobactéria (Saunders et al, 1999; Saunders et al, 2000a), pois promove um acúmulo de macrófagos diferenciados e células epitelióides, os quais são ricos em enzimas responsáveis pela síntese do óxido nítrico (iNOS) e outros fatores micobactericidas (Garcia et al, 1997).

A infecção experimental de camundongos pelo *M. avium*, agente causal mais prevalente da infecção oportunista em pacientes com AIDS, é bem estudada com a finalidade de se conhecer a indução de granulomas e necrose. Após, a infecção intravenosa pelo *M. avium*, o camundongo desenvolve lesões granulomatosas persistentes em todos os órgãos infectados (Collins et al, 1987; Appelberg et al, 1994; Doherty et al, 1997; Hãnsch et al, 1996; Ehlers et al, 2000).

Dunn et al (1995) mostraram que tanto os camundongos infectados por via intravenosa pelo *M. tuberculosis* ou pelo *M. bovis*, apresentaram um progressivo processo inflamatório no tecido pulmonar, enquanto no fígado ocorria uma resolução do processo. A capacidade de controlar a infecção no fígado e a progressiva infecção nos pulmões depende predominantemente da imunidade celular mediada por células T CD4+. Wakeham et al (1998) demonstraram mecanismos alternativos para produção de IFN- $\gamma$  no fígado de camundongos com deficiência de IL-12. No estudo de Wakeham et al (1998), o mecanismo alternativo para a perda de função da IL-12, foi atribuído à presença da IL-18 (fator indutor do IFN- $\gamma$ , descrito por Kohno

et al, 1997) apenas no fígado e não no pulmão de ambos camundongos com perda de gens para IL-12 e camundongos com o operon para IL-12. No pulmão destes camundongos a produção de citocinas Th1, particularmente o IFN- $\gamma$  foi completamente dependente da presença da IL-12 durante todo o curso de infecção micobacteriana pulmonar (71 dias), sugerindo a falta de mecanismos alternativos. Estes resultados demonstram que a histopatologia e as respostas mediadas por citocinas na infecção por micobactérias variam de acordo com o órgão do camundongo.

#### **1.4. RESPOSTA IMUNE À MICOBACTÉRIA**

A micobactéria tem a capacidade de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos. Durante a persistência intracelular, proteínas micobacterianas são produzidas e apresentadas, promovendo assim a ativação de células T (Kauffman, 1993). A resposta imune adquirida começa quando linfócitos T reconhecem os antígenos micobacterianos associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CPH) e apresentados pelas células infectadas. Os linfócitos ativados liberam citocinas que vão atrair células inflamatórias e ativar macrófagos. As citocinas importantes na tuberculose são os fatores quimiotáticos dos macrófagos e linfócitos, especialmente o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), como um fator ativador do macrófago, (Denis, 1991). No local do crescimento do *M. tuberculosis*, as células aparecem sequencialmente seguindo esta ordem: granulócitos polimorfonucleares, macrófagos, células NK, células T  $\gamma\delta$  e células T  $\alpha\beta$  (Dannenberg Jr and Rook, 1994; Chan Kaufmann, 1994).

Os linfócitos T após o reconhecimento dos antígenos micobacterianos, libera o IFN- $\gamma$ , o qual vai atuar ativando macrófagos para destruição do patógeno. Eles não apenas atuam por si mesmo, como também interagem com outras células do sistema imune para promover resistência à micobactéria.

O papel das moléculas tipo I e II do complexo de histocompatibilidade (CPH) e a contribuição das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na infecção experimental por micobactérias foram avaliados, utilizando-se camundongos com deficiência genética tanto para as moléculas do CPH ou para células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Ladel et al,1995a; Senaldi et al, 1999). Os achados demonstram a necessidade de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para uma efetiva proteção contra as micobactérias. Assim como, a falta das moléculas do CPH de classe I e II, refletindo na ausência do efeito das células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente, interfere na imunidade contra micobactérias.

Todas as populações de células T (células T CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ , células T CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  e células T  $\gamma\delta$ ) contribuem para a proteção (Ladel et al. 1995b). Em diversos estudos in vitro, tanto em sistemas murinos como humanos, células T CD4<sup>+</sup> ativadas por micobactérias são potentes produtoras de IFN- $\gamma$  (Emmrich et al.,1986; Kaufmman and Flesh, 1986). O IFN- $\gamma$  é também produzido por células T CD8<sup>+</sup> murinas com especificidade micobacteriana (DeLibero et al., 1988). Esta citocina é responsável, em grande parte, pela resistência à micobacteria. O IFN- $\gamma$ , característico de células Th1, pode estar envolvido na proteção (Barnes et al.,1994; Ivanyi and Thole, 1994; Rook and Bloom, 1994). Ao contrário, células Th2, as quais produzem IL-4, IL-10, IL-13 e IL-5 apresentam uma menor importância na imunidade protetora contra a micobactéria, assim como contra outros patógenos intracelulares (Kaufmann, 1993). Sabe-se que além das células Th1, as células NK produzem IFN- $\gamma$  e destroem

células infectadas por micobactérias (Munk et al., 1990; Bancroft et al., 1991; Follows et al., 1992; Molloy et al., 1993).

Segundo Yag, et al (1997), IFN- $\gamma$  secretado em resposta a *M. bovis* viáveis, atua como um mediador da imunidade protetora do hospedeiro e tem um papel crítico na ativação de macrófagos infectados com o *M. bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG). O IFN- $\gamma$  foi caracterizado como sendo o agente chave da ativação endógena, o qual ativa os mecanismos antimicobacterianos de macrófagos murinos (Rook et al., 1986; Flesh and Kaufmann, 1987).

Por sua vez, os macrófagos infectados pela micobactéria e ativados pelo IFN- $\gamma$  liberam fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Esta molécula é responsável em grande parte pela resposta imune protetora contra micobactérias (Denis, 1991; Kamijo et al, 1993; Flynn et al 1995; Kaneko et al, 1999). O TNF- $\alpha$  tem ação sinérgica com o IFN- $\gamma$  para induzir efeitos antimicobacterianos dos macrófagos murinos in vitro (Flesh and Kaufmann, 1990). Macrófagos murinos ativados pelo IFN- $\gamma$  e lipopolissacarídeo (LPS) ou TNF- $\alpha$  podem desencadear a liberação de óxido nítrico (NO), o qual é requerido para a atividade antimicobacteriana de macrófagos (Dennis, 1991; Chan et al., 1992). A deficiência de TNF resulta na diminuição de expressão de quimiocinas, levando a uma redução do recrutamento celular e dificuldade de formação de granulomas, o que pode promover uma disseminação da micobactéria (Roach, et al, 2002).

O papel do NO na infecção experimental por *M. bovis* BCG foi investigado por Garcia et al (2000), utilizando camundongos deficientes da enzima sintetase 2 de óxido nítrico (NOS2). Eles demonstraram que estes camundongos foram incapazes de eliminar o BCG e morreram entre oito e 12 semanas da infecção com caquexia e



pneumonia, enquanto todos os camundongos controles sobreviveram. Eles concluíram que a incapacidade do camundongo deficiente de NOS2 em destruir o BCG resultou no acúmulo de micobactérias com uma intensa ativação do sistema imune e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, o que levou à morte dos animais.

O TNF- $\alpha$  também parece ter um papel crítico no controle da infecção por BCG in vivo. Existem dados conflitantes a respeito do papel do TNF- $\alpha$  na formação de granulomas. Klinder et al (1989), demonstraram que injeções de anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF- $\alpha$  em camundongos infectados com BCG reduzem a formação de granuloma bem diferenciados, resultando na disseminação do BCG, e morte dos camundongos. Flynn et al (1995) também demonstraram que camundongos tratados com anticorpos neutralizantes de TNF- $\alpha$  são mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* e morrem com lesões de necrose caseosa, entretanto não observaram diferença significativa no número de granulomas formados entre os camundongos controle e experimentais.

Camundongos com deficiência tanto para TNF- $\alpha$ , como para o receptor desta citocina têm sido utilizados para compreender o papel do TNF- $\alpha$  na resposta imune às micobactérias (Kaneko et al, 1999; Senaldi et al 1996; Ehiers et al, 2000). No camundongo deficiente para TNF- $\alpha$  ocorre a infecção disseminada pelo BCG e rápida morte pelo *M. tuberculosis*. Estes experimentos demonstraram que o TNF- $\alpha$  tem um papel central na resposta imune contra a infecção por micobactérias e por induzir a formação do granuloma nos camundongos, pois a sua deficiência resulta em graves infecções ou morte.

Além de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , outras citocinas participam na defesa contra *M. tuberculosis*. Quando inalado, o *M. tuberculosis* é envolvido por macrófagos alveolares, os quais produzem diversas citocinas: IL-1, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  e GM-CSF (Barnes et al., 1994). IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF são moléculas pró-inflamatórias que facilitam o recrutamento de linfócitos e monócitos. O TNF- $\alpha$  e o GM-CSF também ativam macrófagos e podem aumentar a atividade micobactericida. Linfócitos T recrutados para o sítio da infecção produzem citocinas que incluem o IFN- $\gamma$  e a IL-2 (Barnes et al., 1993a), e macrófagos recrutados podem produzir o TNF- $\alpha$  e a 1,25-dihidroxitamina D (Barnes et al., 1989; Cadranel et al., 1990). O IFN- $\gamma$  e a 1,25-dihidroxitamina D aumentam a ativação de macrófagos e a produção de monocinas (Chan and Kaufmann, 1994).

Yamada et al (2000) utilizando camundongos sem os gens para IL-1, mediador de inflamação e indutor de proliferação de fibroblastos (Lonnemann et al, 1995) demonstraram um papel protetor de IL-1 durante o desenvolvimento da inflamação crônica na infecção experimental induzida por *M. tuberculosis*.

Para controlar a inflamação excessiva e dano tecidual, citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF- $\beta$  (transforming growth factor-  $\beta$ ) ambas produzidas por macrófagos no foco da infecção (Barnes et al., 1993b; Maeda et al., 1993), contribuem regulando negativamente a resposta imune, assim limitam a extensão do dano tecidual, gerado pela inflamação. Por outro lado, a produção excessiva de citocinas imunossupressoras contribui para diminuir a resposta imune do hospedeiro favorecendo a infecção

O balanço entre a ativação macrofágica e a resposta imune com dano tecidual durante todo o curso da tuberculose determina a forma da doença. Para o controle

da tuberculose, é necessário o equilíbrio entre estas duas manifestações da resposta imune, para que o hospedeiro possa controlar o crescimento bacilar com reduzida destruição tecidual.

Portanto, a resistência adquirida contra a tuberculose resulta da imunidade mediada por células, com a participação importante dos fagócitos mononucleares e linfócitos T e suas citocinas. Ao mesmo tempo, o macrófago que mais frequentemente encontra-se infectado pelo agente etiológico da tuberculose, tem um papel duplo, promovendo não apenas proteção contra a doença, mas também produzindo substâncias que promovem dano tecidual. De forma similar, células T não apenas são indispensáveis para promover a imunidade, mas também contribuem para a patogênese. Estes tipos celulares (fagócitos mononucleares e linfócitos) juntamente com as citocinas que produzem e liberam podem levar à erradicação do patógeno e/ou lesão tecidual. A deficiência da resposta imune adquirida poderá promover reemergência do patógeno e resultar na forma clínica da doença.

### **1.5. PAPEL DO IFN- $\gamma$**

A deficiência completa do receptor 1 para IFN- $\gamma$  tem sido identificada como causa prévia de infecção fatal por BCG em crianças (Casanova et al, 1995).

Diversos modelos experimentais têm sido estudados para ampliar os conhecimentos da patogênese da infecção pelo *M. bovis* e também delinear o papel das citocinas no controle da doença.

Recentes experimentos envolvendo infecção por micobactérias têm sido realizados utilizando camundongos transgênicos ou com perda de determinados genes para caracterização do papel de linfocinas e citocinas, as quais estão direta ou indiretamente relacionadas com a patogênese. Estudos da resposta imune utilizando mutantes, cujos genes não estão presentes, têm sido necessários para suprir a idéia de mecanismos compensatórios e regulatórios envolvendo diversas citocinas.

Chensue et al (1997b) analisaram detalhadamente respostas granulomatosas mediadas por citocinas do tipo 1 e 2 em camundongos sem os genes para IFN- $\gamma$  e IL-4. Eles exploraram os mecanismos compensatórios e regulatórios nestes modelos de infecção experimental utilizando derivado protéico purificado (PPD) do *M. bovis* e ovos do *Shistosoma mansoni*. Os resultados deste estudo demonstraram que a resposta granulomatosa mediada por uma reação tipo Th1, contra antígenos micobacterianos (PPD), converteu para uma resposta tipo Th2 na ausência do IFN- $\gamma$ . A resposta granulomatosa mediada por Th2 contra antígenos solúveis de ovos do *Shistosoma mansoni*, não converteu para tipo 1 na ausência de IL-4. A resposta do tipo 2 foi mantida, provavelmente, devido à utilização compensatória de citocinas, como IL-13. A expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 parece ser crucial para as respostas Th1 e Th2 o que pode ditar a natureza e extensão da resposta granulomatosa. A conversão da resposta do tipo Th1 para o tipo Th2 esteve associada a um aumento da área do granuloma, acúmulo de eosinófilos e indução de citocinas envolvidas nas respostas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-5).

O IFN- $\gamma$ , citocina secretada por células T ativadas e células NK (*natural killer*), tem efeitos imunomodulatórios sobre diversos tipos de células, principalmente sobre macrófagos (Dalton et al, 1993). O papel do IFN- $\gamma$ , na infecção experimental por

micobactérias, tem sido avaliado por vários autores, como Dalton et al (1993); Flynn et al (1993); Cooper et al (1993); Kamijo R. et al (1993 e 1996) e Yang et al (1997). Alguns destes autores utilizaram camundongos deficientes dos gens responsáveis pela codificação do IFN- $\gamma$ , a fim de avaliar a importância do IFN- $\gamma$  na resistência contra *M. tuberculosis* (Flynn et al, 1993 e Cooper et al, 1993) e *M. bovis* (Dalton et al, 1993; Kamijo et al, 1996 e Yang et al, 1997).

O papel essencial do IFN- $\gamma$  no controle das infecções micobacterianas tem sido demonstrado em camundongos com deficiência genética para IFN- $\gamma$  ou seu receptor (IFN- $\gamma$ R), infectados com *M. tuberculosis*, os quais apresentam necrose caseosa nos tecidos estudados (Flynn et al, 1993 e Cooper et al, 1993) ou infectados com BCG (Dalton et al, 1993 e Kamijo et al, 1996), os quais apresentam alta taxa de mortalidade (Dalton et al, 1993).

Camundongos deficientes dos gens para IFN- $\gamma$  morrem rapidamente (aproximadamente em três semanas) quando infectados com *M. tuberculosis*, mas podem eventualmente sobreviver muitas semanas, quando inoculados com *M. bovis* BCG (Dalton et al., 1993).

Os resultados obtidos e citados anteriormente observaram apenas alguns aspectos do desenvolvimento da infecção por micobactérias, sem contudo fazer uma avaliação quantitativa da reação tecidual.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o papel do IFN- $\gamma$  na resposta inflamatória durante a infecção pelo *M. bovis* no tecido hepático e pulmonar, comparando camundongos com deficiência dos gens responsáveis pela síntese do IFN- $\gamma$  com camundongos que produzem níveis normais de IFN- $\gamma$

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar a carga micobacteriana no fígado e pulmões dos camundongos infectados por via intravenosa com *M. bovis* após 15, 30, 50 e 100 dias de infecção;
- Analisar, morfometricamente, as alterações granulomatosas ocorridas no fígado e pulmões dos camundongos infectados por via intravenosa no mesmo período;
- Avaliar a cinética da resposta granulomatosa no tecido hepático e pulmonar.

### 3. JUSTIFICATIVA

---

A OMS declarou a tuberculose como uma doença de “emergência global”. Em 1996, 80.000 casos novos de tuberculose ocorreram no Brasil. Destes, 4.000 casos de tuberculose em seres humanos foram pelo *M. bovis*. A reemergência da tuberculose como um potencial problema de saúde pública, devido principalmente à alta susceptibilidade dos indivíduos infectados pelo HIV e a proliferação de cepas resistentes a múltiplas drogas, tem despertado o interesse em estudos envolvendo pesquisas sobre imunoregulação utilizando o modelo experimental.

Por ser uma doença de grande importância na saúde pública é imprescindível o desenvolvimento de estudos para o seu melhor entendimento da sua patogênese. As lesões teciduais causadas por micobactérias representam uma potente resposta do sistema imune ao agente infeccioso. Pode-se, então, concluir que a tuberculose é uma doença desencadeada por mecanismos da resposta imune e o estudo destes aspectos é relevante para compreensão da patogênese das micobacterioses.

O IFN- $\gamma$  tem uma participação importante na resposta imune antimicobacteriana através da ativação dos macrófagos. O IFN- $\gamma$  é uma citocina pleiotrópica secretada pelos linfócitos T e células NK, possui efeitos imunorregulatórios sobre várias células imunes. O papel do IFN- $\gamma$  in vivo pode ser sugerido e avaliado, pela utilização de camundongos com deficiência genética, em modelos de infecção sistêmica com *M. tuberculosis* ou *M. bovis*.

Pouco se conhece sobre o papel do IFN- $\gamma$  na regulação das respostas imuno-inflamatórias teciduais, principalmente no fígado e pulmões durante a infecção micobacteriana. No entanto, sabe-se que durante a infecção por BCG, células T CD4+ secretam IFN- $\gamma$  e ativam macrófagos aumentando a atividade microbicida (Dalton et al, 2000).

Neste estudo, avaliamos o papel do IFN- $\gamma$  sobre a formação de granulomas contra o *M. bovis* em camundongos com a falta dos gens responsáveis pela síntese do IFN- $\gamma$  e animais de mesma linhagem que produzem níveis normais de IFN- $\gamma$ .

Apesar das publicações já citadas sobre avaliação do IFN- $\gamma$  na resistência contra o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, tem sido pouco explorado o papel desta citocina no estabelecimento das lesões histopatológicas na tuberculose.

Este trabalho visa contribuir para o entendimento do papel do IFN- $\gamma$  na formação e modulação dos granulomas na resposta tissular ao *M. bovis*.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. ANIMAL EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 entre 21 a 22 gramas de peso. Doze camundongos com deficiência dos gens para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) foram gentilmente cedidos por Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Doze camundongos da linhagem C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$ ) foram utilizados como controle. Todos os animais foram mantidos em microisoladores autoclavados, alimentados com água e ração autoclavadas no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

### 4.2. PREPARO DO INÓCULO

#### ➤ Cultivo da cepa de *Mycobacterium bovis*

A cepa utilizada foi *Mycobacterium bovis* (BCG - ATCC 19.274) obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/ FIOCRUZ. O BCG liofilizado foi reconstituído em salina contendo 0,005% de Tween 80 e usada para semeadura em uma pequena (20 ml) cultura inicial, em meio líquido (7H9).

*M. bovis* foi também cultivado em meio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, MI) enriquecido com suplemento Middlebrook ADC (BBL, Becton Dickinson, Maryland, USA), mais 0,002% de glicerol. A cultura foi incubada a 37°C por 15 dias em atmosfera aeróbica. A partir da cultura de partida foi semeado um inóculo de 0.1ml em caldo 7H9 estéril. Após mais 15 dias de incubação, foi observada sedimentação

com crescimento exponencial. Durante a fase de crescimento logarítmico do *M. bovis*, as bactérias foram colhidas e após processamento (abaixo descrito) utilizadas nos experimentos.

➤ **Preparo dos bacilos para inóculo**

As culturas foram lavadas centrifugando-se a 3.000 rpm durante 10 minutos, por três vezes. Durante o processo de lavagem o sedimento foi ressuspensão em solução salina estéril.

➤ **Quantificação - Medida do inóculo**

O sedimento foi ressuspensão em solução salina estéril e foi rapidamente submetido à dissolução por ultra-som. A suspensão de bacilos foi aliquoteada e estocada a -70°C. Para infecção, os bacilos foram descongelados e a quantidade de micobactérias viáveis foi determinada por diluições seriadas plaqueadas em ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO, Becton Dickinson France S.A.) enriquecido com suplemento Middlebrook OADC (BBL, Becton Dickinson, Maryland, USA) e incubadas a 37°C em atmosfera aeróbica.

O inóculo foi diluído por  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  vezes para plaqueamento, para cada diluição foram semeadas duas placas. Nestas condições, as colônias de bacilos foram visualizadas e quantificadas após 20 dias de cultivo, no entanto as placas permaneceram sob condições ideais de cultivo até 35 dias, para assegurar a quantificação total das unidades formadoras de colônia (CFU) semeadas. Após os procedimentos (descongelamento e lavagem) o *M. bovis* foi inoculado na dose de  $2 \times 10^5$  de bactérias viáveis em 50µl por via intravenosa.

### **4.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

Cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* (BCG) foi usada para padronizar o modelo de infecção micobacteriana e manipulada em Nível 2 de Condições de trabalho em biossegurança. Antes da infecção, a dose de BCG foi lavada e diluída em solução salina a 0,9% e a preparação foi sonicada para assegurar correta dispersão das micobactérias. Os camundongos foram infectados por via intravenosa com injeção de BCG vivos na dose de  $2 \times 10^5$  CFU determinadas por quantidade viáveis após plaqueamento em ágar 7H10, em um volume total de 50 $\mu$ l / dose / camundongo. Esta dose foi estabelecida seguindo padronização de experimentos iniciais (pilotos), onde foi usada a dose de  $2 \times 10^6$ , obtendo-se alterações histológicas significantes. A dose foi reduzida objetivando uma sobrevida maior dos camundongos deficientes dos gens responsáveis pela síntese de IFN- $\gamma$ , os quais, segundo dados de outros autores, são susceptíveis ao *M. bovis* BCG até  $10^7$  bactérias.

Os camundongos foram infectados por via intravenosa através do plexo venoso retro-orbital. Os animais foram observados e pesados semanalmente.

Grupos de três camundongos foram sacrificados nos dias 15, 30, 50 e 100 de infecção.

### **4.4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACILAR**

Em momentos estabelecidos da infecção (15, 30, 50 e 100 dias pós-infecção), os pulmões e fígado foram removidos, de maneira estéril, pesados e homogeneizados. Um fragmento de cada órgão foi retirado para avaliação

histopatológica e o restante utilizado para cultivo do bacilo e contagem de CFU. A porção do órgão utilizada para quantificação da carga bacilar foi pesada e após obtenção dos resultados foi determinado o número de CFU por grama de órgão. O número de bactérias viáveis presentes no fígado e pulmões foi monitorado pelas diluições seriadas ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$ ) dos tecidos homogenizados e incubados em ágar 7H10, mediante a contagem de colônias micobacterianas, observadas após 30 dias de incubação a 37°C, em atmosfera aeróbica.

#### **4.5. HISTOPATOLOGIA**

Os camundongos foram necropsiados nos pontos previamente estabelecidos (15, 30, 50 e 100 dias pós-infecção), fígado e pulmões foram removidos, parte dos órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os pulmões foram fixados por injeção intratraqueal. Os tecidos foram então transferidos, sequencialmente, para o álcool a 70%, 80%, 90% e álcool absoluto, seguido de xilol. Posteriormente, os tecidos hepático e pulmonar foram incluídos em parafina histológica e cortados em micrótomo, obtendo-se secções com espessura de 5µm. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina para caracterização das alterações histopatológicas.

Neste estudo, as lâminas também foram coradas pelo método de Fite-Faraco, no entanto em nenhuma delas obtivemos resultados com BAAR detectáveis. Isso pode ser justificada pela baixa sensibilidade da coloração aliada à diminuta concentração de bacilos viáveis no inóculo utilizado.

#### **4.6. MORFOMETRIA**

As secções histológicas de fígado e pulmões coradas em hematoxina e eosina foram analisadas quantificando-se, morfometricamente, os granulomas quanto à área, à densidade numérica e o percentual da área ocupada por granulomas no fígado e pulmões. Foram selecionadas, randomicamente, cinco áreas do tecido por animal para análise morfométrica. Segundo definição descrita previamente (Cree et al, 1988), formações concêntricas de dez ou mais células mononucleares foram consideradas granulomas. A imagem dos granulomas foi demarcada em seu contorno estrutural com um cursor conectado a um microprocessador, esta imagem representou à área em  $\mu\text{m}^2$ . O número de granulomas por área estudada ( $13,41 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ), representando a densidade numérica, foi estimado pela aplicação da fórmula de Gómez e Weibel (Weibel, 1969). O percentual da área ocupada pelos granulomas foi obtido pelo quociente da soma das áreas demarcadas como granulomas sobre a área seccional total estudada por animal ( $13,41 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ).

#### **4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados da quantificação da carga bacilar e morfometria das granulomas foram determinados pelas médias resultantes dos números obtidos de cada animal por grupo. Para avaliar se a diferença entre as duas médias foram estatisticamente significantes, utilizamos o teste *t* de *Student*.

Neste estudo, a diferença estatística entre os valores comparados entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de *p* foi menor que 0.05.

## 5. RESULTADOS

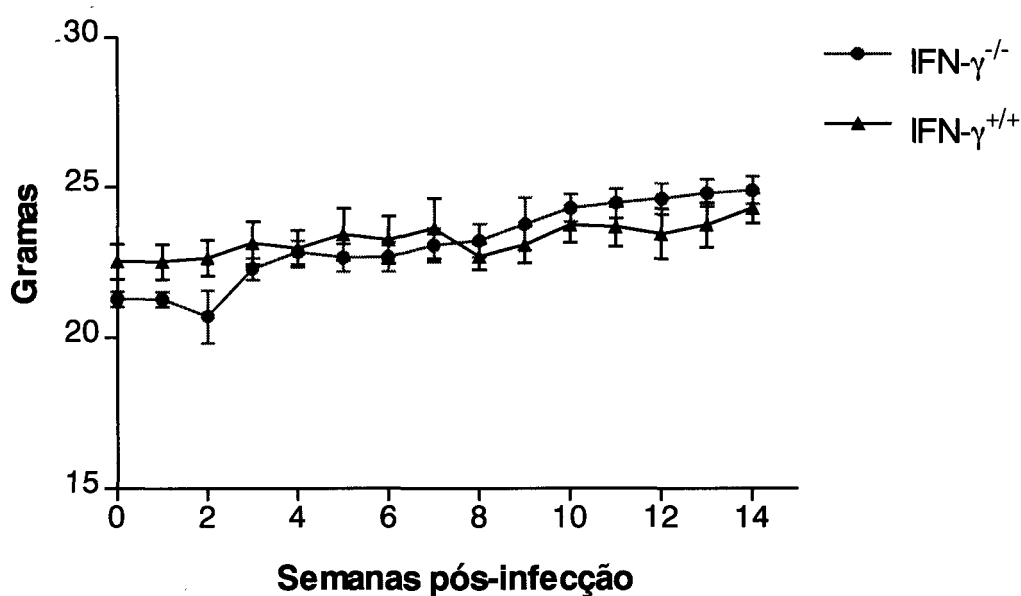
---

### 5.1. CURVA PONDERAL

O peso dos animais constituintes dos dois grupos (IFN- $\gamma^{-/-}$  e IFN- $\gamma^{+/+}$ ) permaneceu constante, demonstrando um discreto aumento de peso durante todo o curso da infecção experimental, como mostra a Figura 1.

Utilizando-se a dose bacteriana de  $2 \times 10^5$  CFU, os camundongos dos dois grupos não apresentaram variações significantes de peso durante os 100 dias avaliados (Figura 1).

**FIGURA 1: Curva Ponderal de IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>**



**Figura 1:** Peso dos animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> infectados por via intravenosa com  $2 \times 10^5$  CFU de *M. bovis*. Cada traço vertical representa a média de peso dos animais estudados, levando-se em consideração o desvio padrão, dentro de um grupo de 12 animais por grupo.

## 5.2. CARGA MICOBACTERIANA

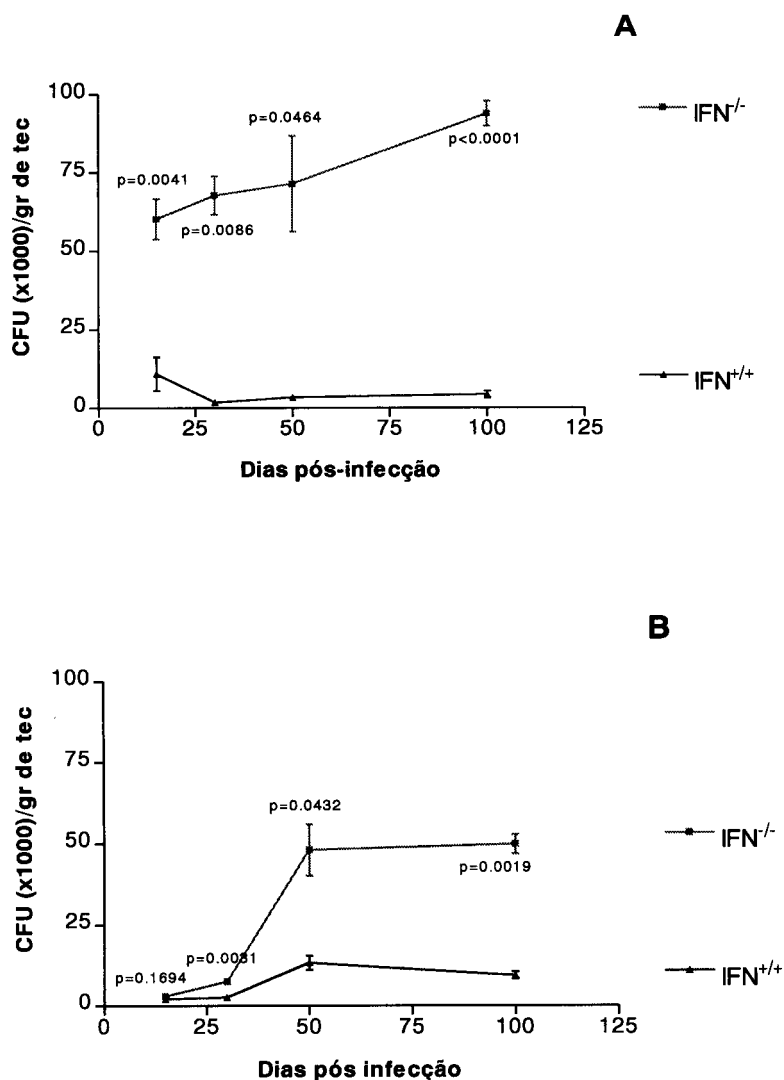
No decorrer do estudo, quantificou-se a carga bacilar no fígado e pulmões dos dois grupos de camundongos. A quantidade de CFU no fígado dos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  aumenta, significativamente, durante o curso da infecção, enquanto que no fígado dos animais IFN- $\gamma^{+/+}$  ocorre um declínio da carga bacilar (Figura 2, Tabela 1 e 2). Esta diminuição, nos animais IFN- $\gamma^{+/+}$ , é acentuada até os 30 dias de infecção, quantificando-se uma carga bacilar aproximadamente seis vezes menor entre os dias 15 e 30 pós-infecção. A partir dos 30 dias pós-infecção nota-se uma estabilização da baixa carga micobacteriana, nesses animais.

Nos pulmões dos dois grupos, observa-se um aumento da carga bacilar, até os 50 dias de infecção, observando-se um aumento aproximado de 16 vezes entre os dias 15 e 50 de infecção nos IFN- $\gamma^{-/-}$  e de sete vezes nos IFN- $\gamma^{+/+}$ . Após esse período (50 dias de infecção) a carga bacilar nos pulmões permanece constante em ambos os grupos.

Quando se compara os dois tecidos, os camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentam diferenças significativas, sendo o fígado o órgão que apresentou um maior quantitativo de CFU durante todo estudo. Enquanto nos animais IFN- $\gamma^{+/+}$  o número de CFU não apresentou diferença significativa entre os dois órgãos, exceto aos 50 dias de infecção, quando o fígado apresentou uma maior carga bacilar que os pulmões.



## FIGURA 2: Carga Bacilar no fígado e pulmões de IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>



**Figura 2:** Quantificação da carga bacilar (CFU total) nos animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> por grama de tecido, em diferentes períodos pós-infecção com  $2 \times 10^5$  CFU de *M. bovis*, por via intravenosa. Três animais em cada ponto estudado tiveram o fígado (A) e os pulmões (B) homogeneizados e plaqueados em ágar 7H10. As colônias foram quantificadas após 30 dias de incubação a 37°C em atmosfera aeróbica. Os pontos representam a média da contagem das CFU de três animais e a barra vertical representa o erro padrão da média.

**Tabela 2: Número de bacilos por grama de tecido pulmonar**

<b>Grupos experimentais</b>			
	<b>IFN-<math>\gamma</math><sup>-/-</sup></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math><sup>+/+</sup></b>	
<b>Dias</b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM (CFU* x 10<sup>3</sup>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM (CFU* x 10<sup>3</sup>)</b>	<b>p</b>
<b>15</b>	2,96 $\pm$ 0,37	2,02 $\pm$ 0,43	0.1694
<b>30</b>	7,46 $\pm$ 0,25	2,54 $\pm$ 0,61	0.0031
<b>50</b>	48,13 $\pm$ 7,89	13,29 $\pm$ 2,19	0.0432
<b>100</b>	49,86 $\pm$ 2,97	9,38 $\pm$ 1,13	0.0019

\*CFU = Unidades formadoras de colônia

### 5.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica constou do exame microscópico óptico das lâminas coradas por H&E e a análise morfométrica dos granulomas encontrados no tecido hepático e pulmonar.

Nossos achados histopatológicos, aos 15 dias de infecção, revelam nítidas diferenças entre os camundongos deficientes e camundongos produtores de IFN- $\gamma$ , principalmente no tecido hepático. Não foram observados granulomas no fígado dos IFN- $\gamma^{-/-}$  (Figura 3A), apesar do grande número de bacilos estar presente neste tecido com 15 dias pós-infecção (Figura 3A). No entanto, observa-se o extenso infiltrado inflamatório, com predominância de células mononucleares, já no início da formação granulomatosa, no fígado dos animais IFN- $\gamma^{+/+}$  (Figura 3B). A análise morfométrica, aos 15 dias pós-infecção, demonstrou significativa diferença no fígado dos dois grupos, em todos os parâmetros estudados (Figura 6, 7 e 8, Tabela 3). Isso sugere que o IFN- $\gamma$  tem um papel fundamental no controle inicial da infecção, pois os camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$  apresentam uma menor carga bacilar e um acentuado processo inflamatório hepático.

Aos 15 dias de infecção, foram observados granulomas no tecido pulmonar dos dois grupos de camundongos estudados, no entanto houve diferença significativa na densidade numérica (Figura 9). Poucos granulomas foram observados nos pulmões dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$  e esses eram também menores que os granulomas encontrados nos camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$ , no mesmo período (Figura 10).

Após 30 dias de infecção, começam aparecer nos animais  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  granulomas no parênquima hepático, no entanto, são raros e pequenos (Figura 6 e 7), sem a presença de necrose caseosa central, ocupando uma pequena percentagem de área ocupada no tecido (Figura 8). Nos animais que produzem  $\text{IFN-}\gamma$ , foram observados muitos granulomas situados nas três zonas do ácino hepático (Figura 3C). A comparação da área ocupada pela inflamação foi significativamente diferente entre os dois grupos (Figura 6). Estes granulomas apresentavam um tamanho maior que os observados em camundongos  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (Figura 7) e conseqüentemente o percentual da área ocupada pelas alterações granulomatosas foi significativamente maior nos animais  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  que nos camundongos deficientes de  $\text{IFN-}\gamma$  (Figura 8).

Nos pulmões dos dois grupos de camundongos, aos 30 dias de infecção, foram observadas formações granulomatosas, com número e tamanho semelhantes (Figura 9 e 10, Tabela 4) e portanto o percentual da área ocupada pelos granulomas não apresentou diferença significativa (Figura 11, Tabela 4). Tais granulomas eram compostos predominantemente por células mononucleares.

Aos 50 dias de infecção são observados pequenos e poucos granulomas sem necrose central, no fígado dos animais deficientes de  $\text{IFN-}\gamma$  (Figura 4A e 4B). Neste mesmo período, são observados granulomas nas três áreas do ácino hepático dos  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  (Figura 4C). Na periferia destes granulomas observam-se muitos linfócitos (Figura 4D). A diferença do número de granulomas formados 50 dias pós-infecção, entre os dois grupos estudados, é significativa, sendo maior o número de granulomas nos animais  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  (Figura 6), mas o tamanho dos granulomas é semelhante (Figura 7). O que ocorre nesse período é a diminuição do tamanho dos granulomas presentes no fígado dos camundongos  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  em relação aos períodos

anteriormente estudados. A comparação da densidade numérica dos granulomas dos animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e dos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> evidencia uma considerável diferença, assim como o percentual da área ocupada pela inflamação também é significativamente menor nos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  (Figura 8).

No tecido pulmonar, aos 50 dias de infecção, nota-se presença de granulomas nos dois grupos de camundongos, mas são semelhantes em número e tamanho (Figura 5A, 5B, 5C, 9 e 10), assim nestes animais o percentual da área ocupada pelos granulomas não foi diferente estatisticamente (Figura 11).

Aos 100 dias de infecção, observa-se presença de granulomas bem definidos no tecido hepático. Entretanto, no fígado dos animais IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>, ocorre uma significativa diminuição no número e tamanho dos granulomas, quando se compara com os períodos anteriores (Figura 6 e 7). O percentual da área ocupada pelas alterações granulomatosas fígado dos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> foi também menor que nos primeiros pontos estudados (Figura 8). Esses achados sugerem que ocorre uma modulação do processo inflamatório nos animais que produzem IFN- $\gamma$ . Nos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, aos 100 dias de infecção, as alterações granulomatosas permanecem nos mesmos níveis quantificados nos períodos anteriores.

Nos pulmões dos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ , com 100 dias de infecção, observa-se granulomas em número e tamanho semelhantes aos animais IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> e, sobre estes aspectos quantitativos, permanece como encontrado desde os 30 dias de infecção. Neste período, a composição celular dos granulomas pulmonares presentes nos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> é diferente dos animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. A predominância de células epitelióides no centro dos granulomas foi notada nos

camundongos produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 5D), enquanto nos IFN- $\gamma^{-/-}$  estas células foram ausentes.

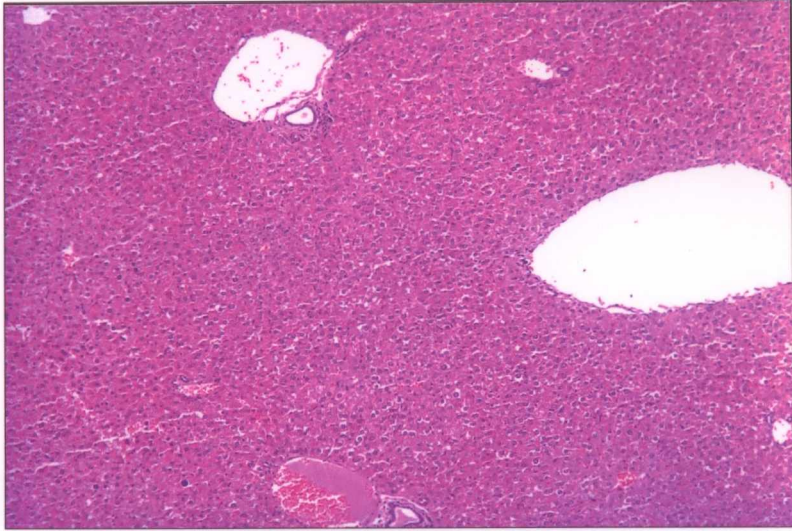
## CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

**Figura 3:** Alterações histopatológicas observadas no fígado.  
Coloração Hematoxilina e Eosina.

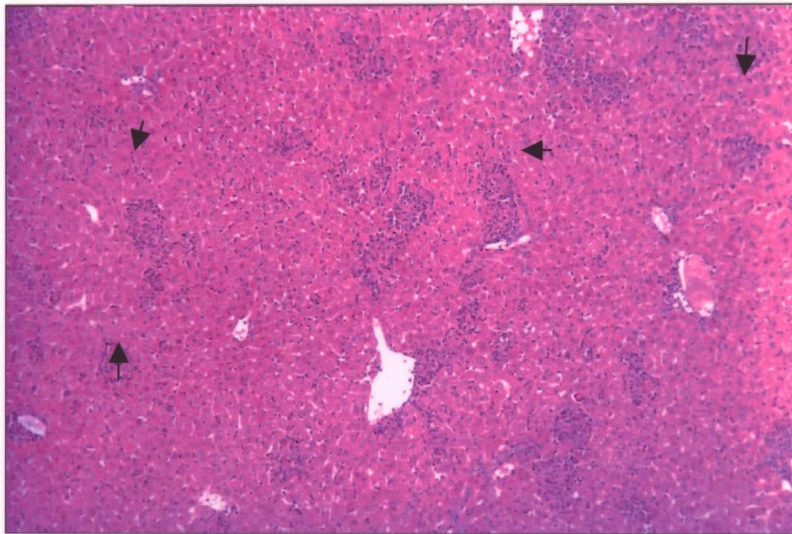
- A:** Fígado do animal IFN- $\gamma^{-/-}$  com 15 dias pós infecção.  
Aumento de 100X.
- B:** Fígado do animal IFN- $\gamma^{+/+}$  com presença de infiltrado inflamatório difuso e formação de granulomas (setas) com 15 dias pós infecção.  
Aumento de 100X.
- C:** Detalhe do granuloma presente no tecido hepático do camundongo IFN- $\gamma^{+/+}$  aos 30 dias de infecção.  
Aumento 400X.

FIGURA 3

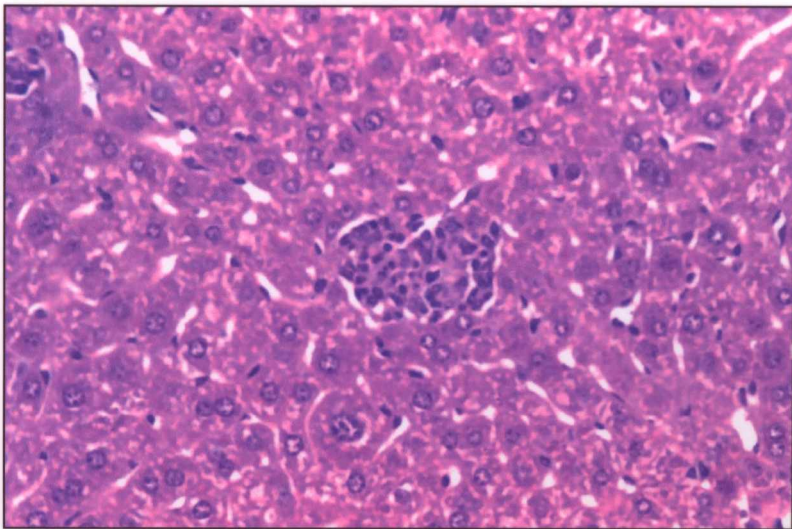
**A**



**B**



**C**





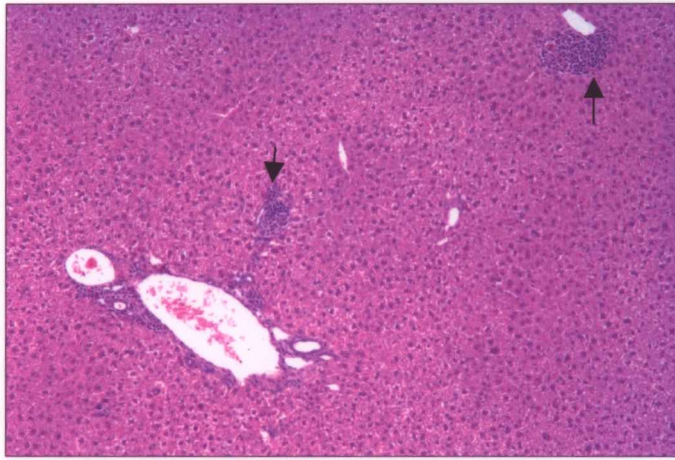
## CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

**Figura 4:** Alterações histopatológicas observadas aos 50 dias de infecção, no tecido hepático.  
Coloração Hematoxilina e Eosina.

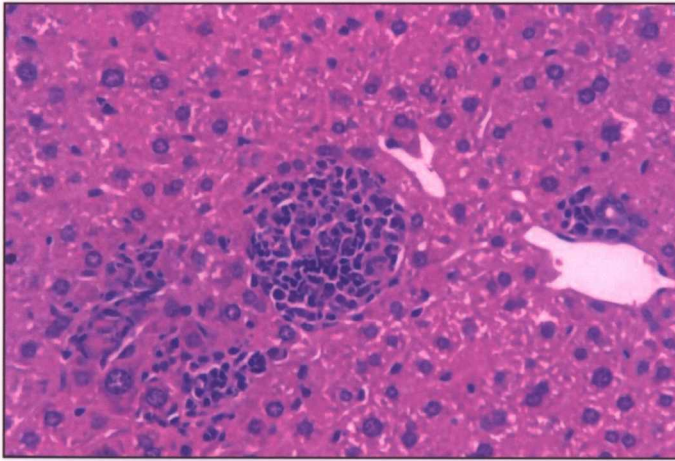
- A:** Fígado do animal  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  com presença de raros e pequenos granulomas sem necrose caseosa central (setas).  
Aumento de 100X.
- B:** Detalhe do granuloma formado em camundongos  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ , sem necrose caseosa central.
- C:** Fígado do animal  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  com presença de granulomas (setas).  
Aumento 100X
- D:** Detalhe do granuloma no tecido hepático do animal  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  após 50 dias de infecção. Presença de mononucleares e polimorfonucleares na periferia.  
Aumento 400X.

FIGURA 4

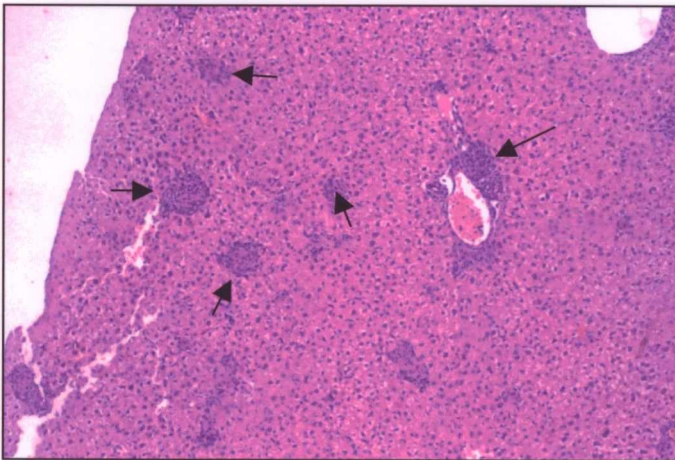
**A**



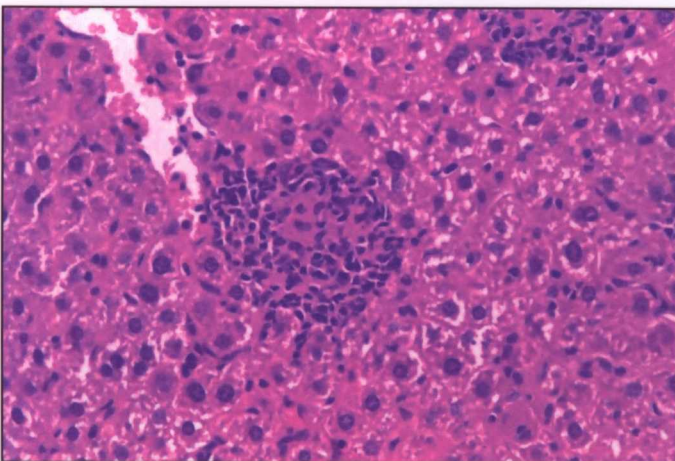
**B**



**C**



**D**



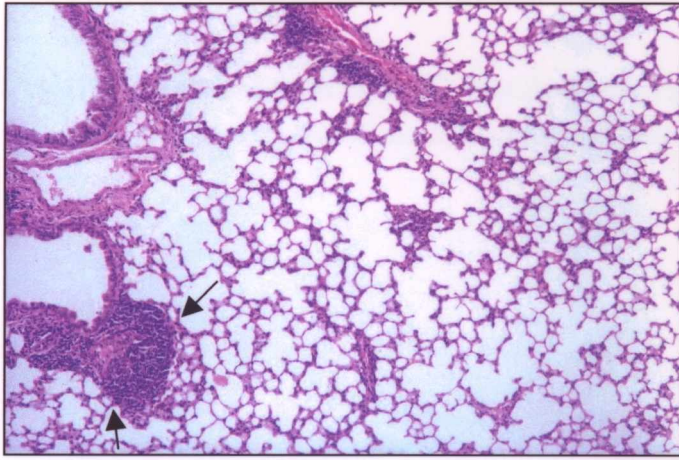
## CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

**Figura 5:** Alterações histopatológicas observadas no tecido pulmonar. Coloração Hematoxilina e Eosina.

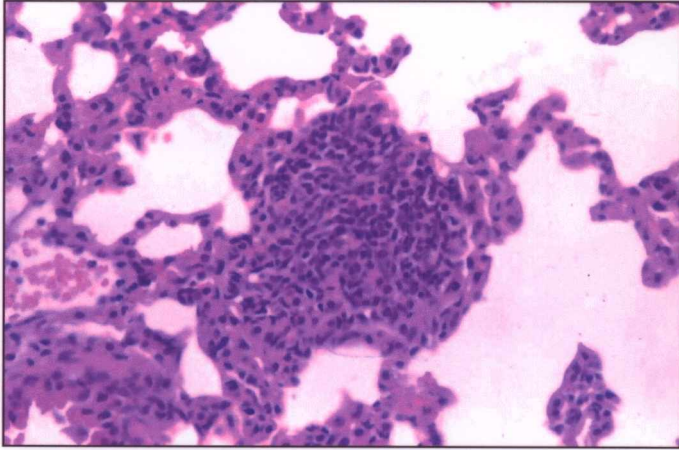
- A:** Pulmão do animal IFN- $\gamma^{-/-}$ , com 50 dias de infecção, revel presença de granulomas sem necrose caseosa central, (setas). Aumento de 100X.
- B:** Detalhe do granuloma formado aos 50 dias de infecção nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ . Aumento de 400X.
- C:** Pulmão do animal IFN- $\gamma^{+/+}$  com 50 dias de infecção, revela granulomas (setas). Aumento de 100X.
- D:** Detalhe do granuloma observado nos pulmões dos camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$  aos 100 dias de infecção. Células epitelióides ao centro e presença linfócitos periféricamente (coroa linfocitária). Aumento de 400X.

FIGURA 5

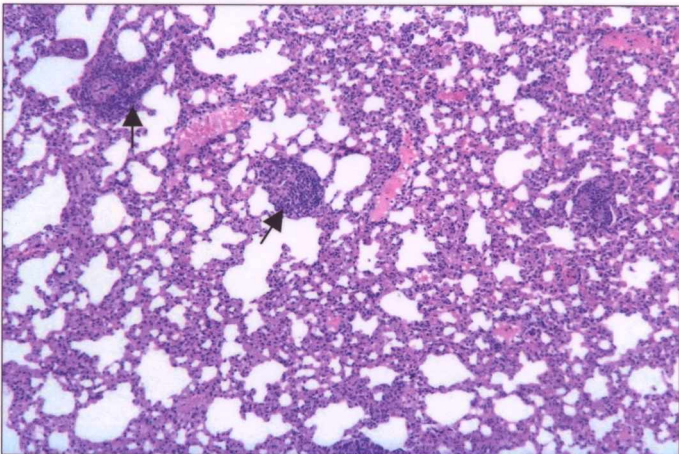
**A**



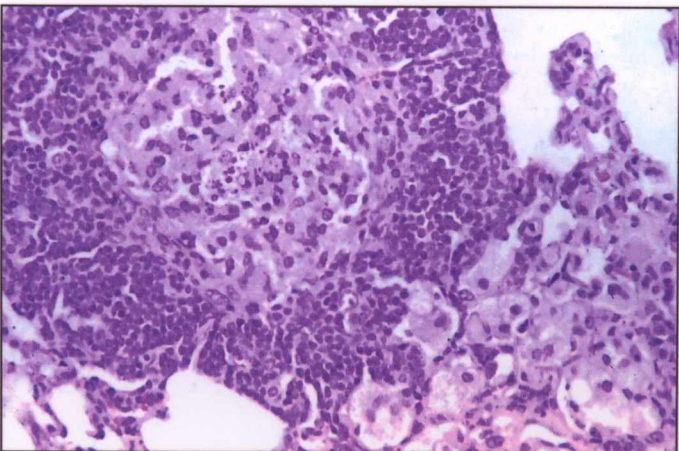
**B**



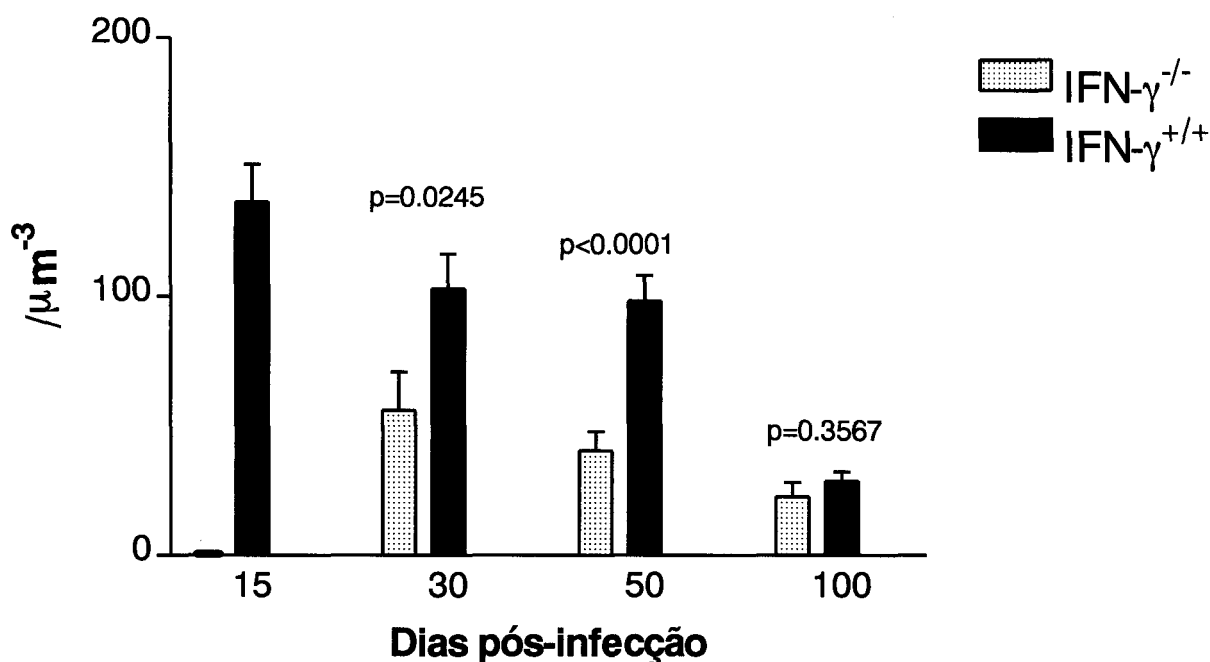
**C**



**D**

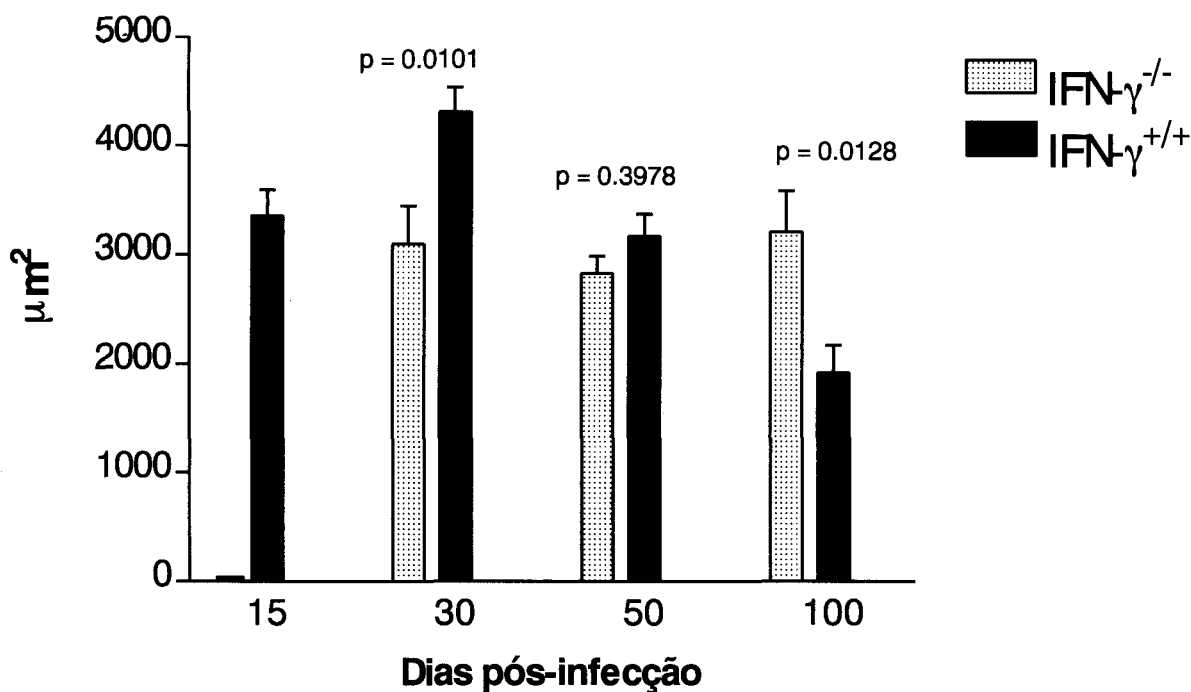


**Figura 6: Densidade Numérica dos Granulomas Hepáticos**



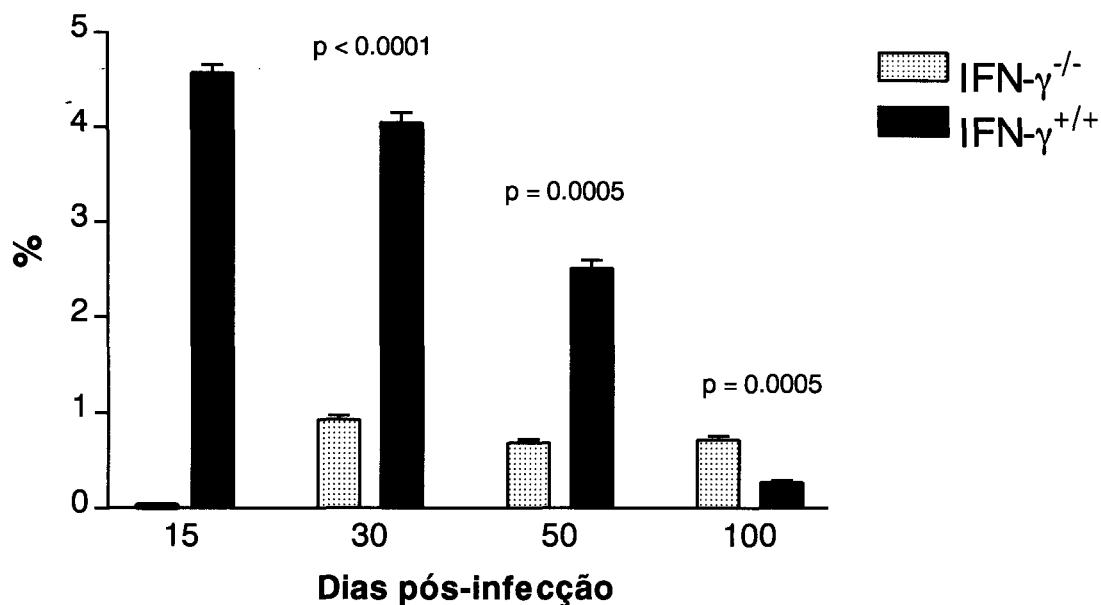
**Figura 6:** Segundo demonstração gráfica ocorreram diferenças significativas nos três primeiros pontos estudados, onde os camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  apresentaram um menor número de granulomas por volume de tecido avaliado. Aos 15 dias de infecção não foram observados granulomas nos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  e aos 100 dias de infecção ocorreu uma significativa ( $p = 0.0001$ ) redução da densidade numérica dos granulomas no tecido hepático dos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>.

**Figura 7: Área dos Granulomas Hepáticos**



**Figura 7:** O gráfico acima representa a média do tamanho da área dos granulomas presentes no tecido hepático nos dois grupos avaliados. Estatisticamente, houve diferenças significativas entre os dois grupos, exceto com 50 dias de infecção. Os granulomas presentes no tecido hepático de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentaram uma menor área comparando-se aos granulomas presentes em IFN- $\gamma^{+/+}$ , nos primeiros pontos estudados. Os granulomas presentes no fígado dos animais IFN- $\gamma^{+/+}$  se tornam menores, mais significativamente, aos 100 dias de infecção, do que os granulomas dos IFN- $\gamma^{-/-}$ .

## Figura 8: Percentual da Área Ocupada pelos Granulomas Hepáticos



**Figura 8:** O percentual de área tecidual ocupado pelos granulomas é obtido pelo quociente da somatória das áreas granulomatosas sobre a área total avaliada. O percentual da área ocupada pelos granulomas no tecido hepático dos camundongos IFN-γ<sup>-/-</sup> foi menor que dos IFN-γ<sup>+/+</sup> nos primeiros pontos estudados. Aos 15 dias de infecção, no tecido hepático do animal IFN-γ<sup>-/-</sup>, não foram observadas alterações granulomatosas. Nos animais IFN-γ<sup>+/+</sup>, o percentual da área ocupada pelas alterações granulomatosas apresenta uma progressiva diminuição e aos 100 dias é relativamente menor que nos camundongos deficientes de IFN-γ.

### Tabela 3: Dados Morfométricos dos Granulomas Hepáticos

**Tabela 3A: Densidade numérica dos granulomas presentes no parênquima hepático**

Dias pós-infecção	Grupos experimentais		p
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Densidade Numérica ( $/\mu\text{m}^{-3}$ ) Média $\pm$ SEM	Densidade Numérica ( $/\mu\text{m}^{-3}$ ) Média $\pm$ SEM	
15	0	136.5 $\pm$ 14.57	
30	31.00 $\pm$ 6.80	80.30 $\pm$ 9.11	0.0245
50	22.70 $\pm$ 6.10	79.17 $\pm$ 12.81	<0.0001
100	22.40 $\pm$ 6.30	20.68 $\pm$ 6.97	0.3567

**Tabela 3B: Área dos granulomas presentes no parênquima hepático**

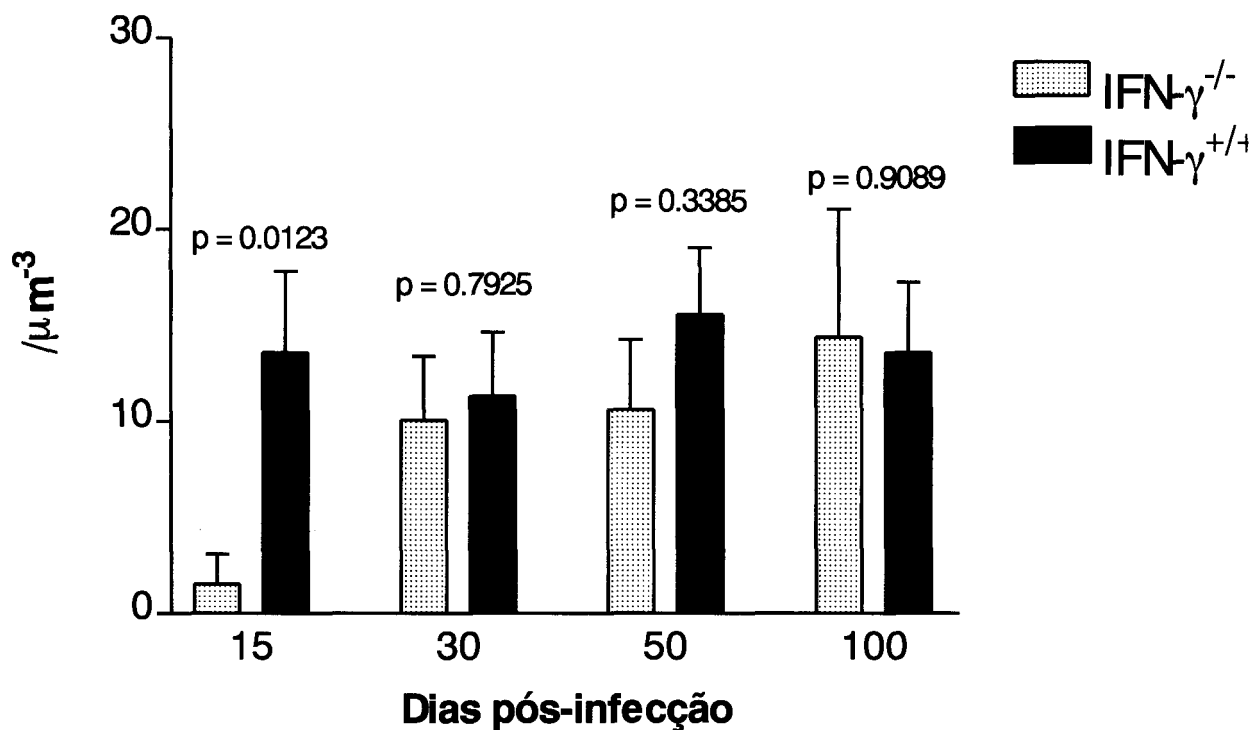
Dias pós-infecção	Grupos experimentais		p
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ ) Média $\pm$ SEM	Área ( $\mu\text{m}^2$ ) Média $\pm$ SEM	
15	0	3352 $\pm$ 237.1	
30	3094 $\pm$ 348.0	4305 $\pm$ 228.5	0.0101
50	2824 $\pm$ 157.8	3165 $\pm$ 205.5	0.3978
100	3200 $\pm$ 381.5	1911 $\pm$ 255.2	0.0128

**Tabela 3C: Percentual da área do fígado ocupada pelos dos granulomas**

Dias pós-infecção	Grupos experimentais		p
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Percentual da área ocupada(%) Média $\pm$ SEM	Percentual da área ocupada(%) Média $\pm$ SEM	
15	0	4.5735 $\pm$ 0.08	
30	0.9235 $\pm$ 0.04	4.0465 $\pm$ 0.10	<0.0001
50	0.6800 $\pm$ 0.04	2.5135 $\pm$ 0.08	0.0005
100	0.7100 $\pm$ 0.04	0.2665 $\pm$ 0.02	0.0005

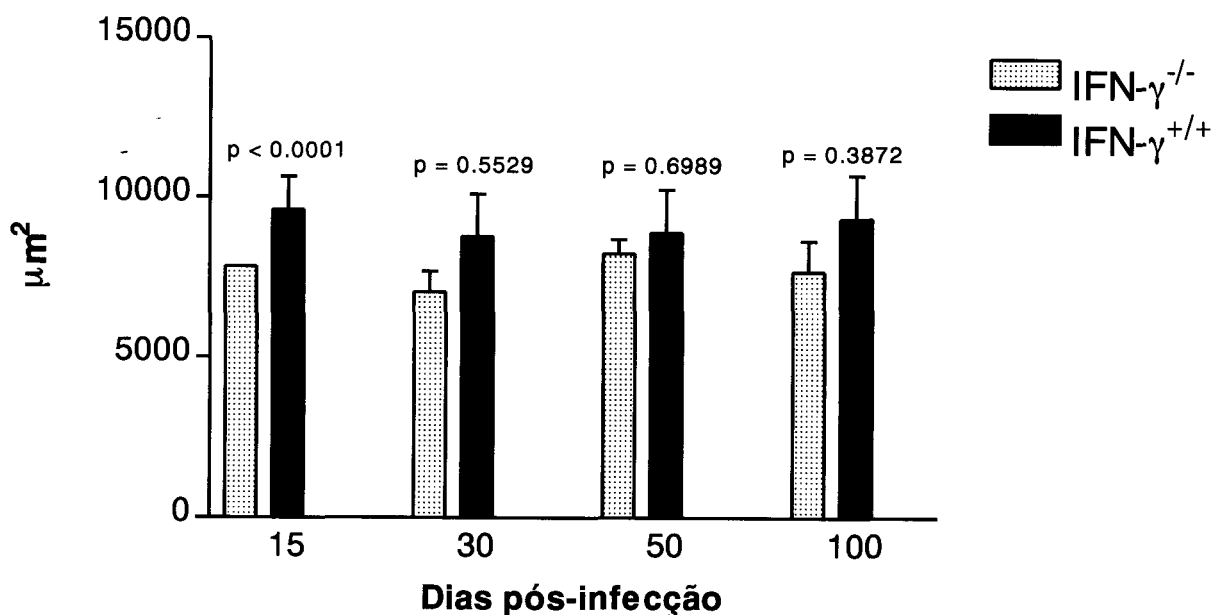


**Figura 9: Densidade Numérica dos Granulomas Pulmonares**



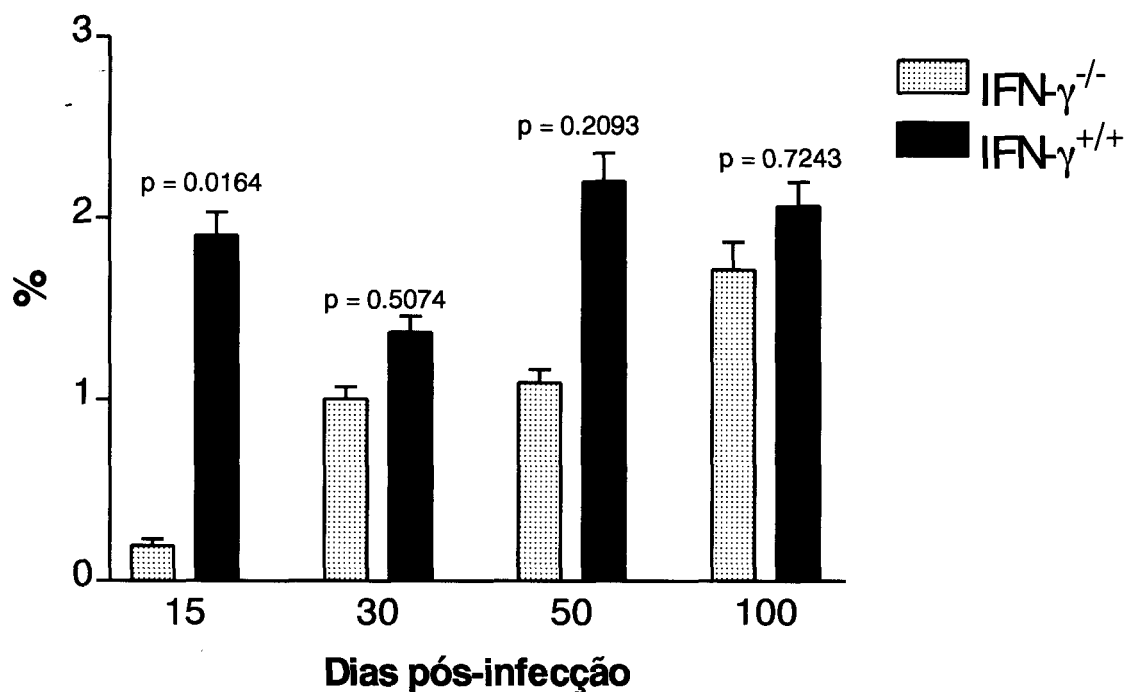
**Figura 9:** A densidade numérica dos granulomas representa o número de formações granulomatosas em relação à área analisada. Ocorreu diferença significativa entre os dois grupos de camundongos, apenas no primeiro ponto estudado (15 dias), onde o animal deficiente de IFN- $\gamma$  apresentou uma menor densidade numérica.

**Figura 10: Área dos Granulomas Pulmonares**



**Figura 10:** O gráfico acima corresponde ao tamanho dos granulomas observados no tecido pulmonar dos dois grupos experimentais. Os resultados mostram que o tamanho dos granulomas presentes nos pulmões destes animais é semelhante.

## Figura 11: Percentual da área ocupada pelos granulomas pulmonares



**Figura 11:** O percentual da área ocupada pelos granulomas presentes no tecido pulmonar foi significativamente menor nos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> no primeiro ponto estudado (15 dias pós-infecção), nos demais períodos avaliados não houve diferença. No entanto, observa-se que a área dos granulomas aumente em ambos os grupos de animais infectados pelo *M. bovis*.

## Tabela 4: Dados Morfométricos dos Granulomas Pulmonares

### Tabela 4A: Densidade numérica dos granulomas presentes nos pulmões

Dias pós-infecção	Linhagens de Camundongos		P
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Densidade Numérica ( $\mu\text{m}^{-3}$ ) Média $\pm$ SEM	Densidade Numérica ( $\mu\text{m}^{-3}$ ) Média $\pm$ SEM	
15	1.55 $\pm$ 1.55	13.59 $\pm$ 4.23	0.0123
30	10.07 $\pm$ 3.31	11.30 $\pm$ 3.33	0.7925
50	10.61 $\pm$ 3.66	15.60 $\pm$ 3.50	0.3385
100	14.39 $\pm$ 6.65	13.60 $\pm$ 3.65	0.9089

### Tabela 4B: Área dos granulomas presentes no parênquima pulmonar

Dias pós-infecção	Linhagens de Camundongos		p
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ ) Média $\pm$ SEM	Área ( $\mu\text{m}^2$ ) Média $\pm$ SEM	
15	7820	9590 · 1039.0	Não comparável
30	7024 · 642.5	8756 · 1340.0	0.5529
50	8222 $\pm$ 446.8	8879 · 1347.0	0.6989
100	7656 $\pm$ 980.9	9325 $\pm$ 1364.0	0.3872

### Tabela 4C: Percentual da área dos pulmões ocupada pelos granulomas

Dias pós-infecção	Linhagens de Camundongos		p
	IFN- $\gamma^{-/-}$	IFN- $\gamma^{+/+}$	
	Percentual da área ocupada(%) Média $\pm$ SEM	Percentual da área ocupada(%) Média $\pm$ SEM	
15	0.1934 $\pm$ 0.04	1.9045 $\pm$ 0.13	0.0164
30	1.0035 $\pm$ 0.07	1.3710 $\pm$ 0.09	0.5074
50	1.0935 $\pm$ 0.07	2.2035 $\pm$ 0.16	0.2093
100	1.7150 $\pm$ 0.15	2.0865 $\pm$ 0.14	0.7243

## 6. DISCUSSÃO

---

A taxa de mortalidade na infecção experimental por micobactérias tem sido extensivamente utilizadas com o objetivo de avaliar a gravidade da infecção em camundongos e para demonstrar o grau de resistência de diversas linhagens ao bacilo. Os camundongos C57BL/6 sobrevivem durante longos períodos infectados por via intravenosa com *M. bovis* BCG (Garcia et al, 2000; Kaneko et al, 1999). Durante o transcorrer do nosso estudo, os animais sobreviveram a infecção. O peso dos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  ou IFN- $\gamma^{+/+}$  foi registrado semanalmente e utilizado como parâmetro para avaliar os aspectos clínicos e para demonstrar o grau de debilidade física dos animais infectados pelo *M. bovis*, por via intravenosa. O peso dos dois grupos permaneceu constante, o que indica que a infecção não foi severa, demonstrando baixa gravidade.

Dunn & North (1995) realizaram um extenso trabalho avaliando o tempo de sobrevivência de camundongos infectados, por via intravenosa, com diversas cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. A infecção por cepas virulentas é fatal em um período que varia de 60 a 120 dias. Os camundongos infectados com *M. bovis* BCG sobreviveram por mais de 350 dias. Flynn et al (1993) demonstraram que o tempo de sobrevivência dos camundongos com ausência dos gens para IFN- $\gamma$  infectados por via intravenosa com *M. tuberculosis* cepa Erdman na dose de  $10^6$  CFU foi de 15 dias, enquanto os camundongos heterozigotos da mesma linhagem sobreviveram mais que 60 dias pós-infecção. Em nossos resultados os camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ , assim como os que produzem IFN- $\gamma$ , quando infectados com  $2 \times 10^5$  CFU de

*M. bovis* por via intravenosa, permaneceram vivos durante todo o período de estudo que foi 100 dias.

Kamijo et al (1993) utilizaram um inóculo de  $2 \times 10^7$  *M. bovis* BCG / camundongo por via intravenosa e demonstraram uma taxa de sobrevivência em camundongos com ausência do gene do receptor para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) significativamente menor que os camundongos capazes de sintetizar o receptor. Todos os camundongos IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> morreram entre 49 a 55 dias após inoculação de BCG, enquanto todos os controles sobreviveram à infecção. Mortalidade precoce de 100% dos animais, após inoculação intravenosa de BCG, foi também documentada por Dalton et al (1993) em camundongos com ausência do gene estrutural para IFN- $\gamma$ . Para obter um estudo da infecção em estágios mais avançados, optamos por usar uma concentração infectante menor, considerada subletal, já que se tem relatado que a alta mortalidade está diretamente relacionada a altos níveis de carga micobacteriana (Ladel et al, 1995). Com um inóculo de  $2 \times 10^5$  CFU de *M. bovis* conseguimos avaliar a evolução da infecção até 100 dias, sem que fosse observada nenhuma debilidade física nos dois grupos de camundongos (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>).

A contagem do número de colônias tem sido utilizada no modelo de infecção experimental com *M. bovis*, como parâmetro para avaliar a capacidade de sobrevivência e multiplicação do bacilo em diferentes órgãos durante a evolução da infecção. Nossos achados demonstraram aumento progressivo da carga bacilar no fígado dos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, o que sugere uma falha no controle da infecção nesses animais. Os camundongos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> apresentaram menor número de CFU no fígado quando comparada com dos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> durante todo o período estudado. Adicionalmente, a carga bacilar do *M. bovis* no fígado dos animais

controles apresentou um decréscimo progressivo, o que não ocorreu nos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ . Esses achados concordam com os resultados obtidos por Kamijo et al (1993), os quais demonstraram que o número bacilos presentes no tecido hepático foi maior em camundongos deficientes do receptor para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) do que em animais controles. Neste estudo houve diferença significativa em até seis semanas de infecção. Assim, não só o receptor, como a molécula do IFN- $\gamma$  parece influenciar na capacidade de sobrevivência e multiplicação do *M. bovis* no fígado.

Durante todo o período do nosso estudo, notou-se uma progressão da carga bacilar no tecido pulmonar de animais dos dois grupos. As CFU quantificadas nos pulmões do grupo IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram significativamente maiores que nos IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>. Portanto, a de sobrevivência e multiplicação do *M. bovis* no pulmão também parece sofrer influência do IFN- $\gamma$ .

No início da infecção (15 dias) observou-se uma maior carga bacilar no fígado dos dois grupos (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup>), quando comparada com a carga de bacilos presente nos pulmões de ambos. Isso pode ser explicado pela via de infecção intravenosa. Embora todo inóculo de micobactérias injetado por via intravenosa, obrigatoriamente, passe pelo pulmão (vasoscapilares), imediatamente após a injeção venosa poucos bacilos ficam retidos neste órgão durante as primeiras 24 horas. A número de bacilos quantificados nos homogeneizados pulmonares, neste tempo, representam menos que 0,1% do inóculo original (Collins et al, 1996).

Quando micobactérias são injetadas por via intravenosa em camundongos, o inóculo é dividido entre o fígado, baço e pulmão em uma proporção de 90:9:1, respectivamente. Estes bacilos multiplicam-se por duas a quatro semanas antes do

surgimento da resposta imune e limita-se ao crescimento no fígado e baço (McMurray, 1996).

Aos 30 dias de infecção, nos camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$ , a carga bacilar foi maior no pulmão que no fígado, com aumento progressivo dessa diferença. Os animais IFN- $\gamma^{-/-}$  permaneceram durante todo o nosso estudo com maior número de colônias no fígado que nos pulmões. Com esses resultados, demonstrou-se a importância do IFN- $\gamma$  para controle da multiplicação do *M. bovis*, principalmente no fígado.

No pulmão, o papel do IFN- $\gamma$  parece ser mais importante nos estágios iniciais, na fase de reconhecimento da micobactéria pelas células murinas. A importância do IFN- $\gamma$  nos processos iniciais da infecção, particularmente da tuberculose, foi descrita previamente por vários autores, como Walkeham et al (1998) que demonstraram um pico de produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aos 27 dias de infecção por *M. bovis* em camundongos, e que estas citocinas apresentam um declínio progressivo até os 71 dias de infecção (tempo máximo de observação neste estudo).

Nossos resultados evidenciam um aumento significativo da carga bacilar, entre 30 e 50 dias de infecção, no pulmão do camundongo deficiente de IFN- $\gamma$ . Esse aumento é contido após 50 dias e o número de CFU permanece constante até os 100 dias. Esse fato sugere um mecanismo compensatório pela deficiência de IFN- $\gamma$ , o qual poderia ser substituído em períodos mais avançados da infecção.

Segundo Kamijo et al (1993), a área ocupada por lesões granulomatosas duas semanas após infecção por BCG foi 62% menor no fígado de camundongos deficientes de receptor para IFN- $\gamma$  que nos camundongos que tem esse receptor. Essa diferença indica que o IFN- $\gamma$  é importante no processo inicial da formação de



granulomas, porém na sua ausência ou do seu receptor, outras citocinas podem substituí-lo, mais tardiamente. Os nossos dados indicam que tal substituição no fígado é menos eficiente que nos pulmões.

Pelos nossos resultados, observa-se que a formação de granulomas hepáticos nos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  é tardia, ocorrendo apenas 30 dias pós-infecção. A formação de granulomas em períodos mais avançados da infecção deve-se provavelmente a mecanismos compensatórios por outras citocinas, como por exemplo, GM-CSF, IL-2 e IL-18 (Barnes et al, 1993a e Walkeham et al, 1998).

Em camundongos deficientes de TNF infectados por *M. smegmatis*, a indução de quimiocinas ocorreu tardiamente (21 dias de infecção), apresentando uma baixa expressão de RNA mensageiro (RNAm) para RANTES, Eotaxin, MIP1- $\alpha$ , MIP-2 e MCP-1, durante as duas primeiras semanas. A deficiência de quimiocinas influencia negativamente o recrutamento celular dificultando a formação de granulomas (Roach et al, 2002).

Na tuberculose a formação do granuloma contribui em parte para o controle da infecção. As células que compõe o granuloma, quando ativadas, eliminam as micobactérias, restringindo assim a disseminação e o progresso da infecção. Em nossos resultados, os camundongos deficientes na produção de IFN- $\gamma$  não forma rapidamente granulomas, o que resulta em uma maior proliferação do bacilo e maior quantidade presente nos tecidos, principalmente fígado. Neste caso, quando se observa uma alta carga bacilar, paradoxalmente, a uma tênue resposta inflamatória, acredita-se ou que os bacilos, por serem bactérias intracelulares facultativas, podem estar multiplicando-se fora das células, de forma disseminada, ou que podem estar

multiplicando-se dentro de células, como células de Kupffer inativas pela ausência do IFN- $\gamma$ .

Os aspectos histológicos do fígado, durante todo o estudo, entre os dois grupos de camundongos, foram distintos quanto ao percentual da área ocupada pelos granulomas. No fígado dos camundongos deficientes para o IFN- $\gamma$ , os granulomas foram raros e pequenos, enquanto no animal que produz IFN- $\gamma$ , o processo inflamatório foi mais exacerbado nos primeiros pontos estudados e apresentou uma tendência à modulação, principalmente aos 100 dias de infecção. Segundo Orrell e colaboradores (1992), as lesões hepáticas mostram-se proeminentes até a terceira semana de infecção com o *M. tuberculosis*, a partir daí a uma progressiva redução no percentual de área ocupada por granulomas, no tamanho dos granulomas, e havendo também redução na carga bacilar nesse período. Silva e colaboradores (1998) demonstraram que o processo de modulação hepática, pode ser também visto em estudos experimentais utilizando outros patógenos, como *Schistosoma mansoni*.

A diminuição de todos os parâmetros analisados morfometricamente, apenas no tecido hepático dos animais IFN- $\gamma^{+/+}$ , sugere que o IFN- $\gamma$  é uma citocina importante para modular o processo inflamatório e sua ação ocorre seguindo padrões teciduais.

As diferenças foram claras e nítidas entre os dois grupos, quando se avaliam as alterações histopatológicas no tecido hepático e pulmonar aos 15 dias de infecção, no entanto os achados histopatológicos foram bastante semelhantes nos pulmões no decorrer da infecção.

Os aspectos quantitativos das alterações granulomatosas presentes no tecido pulmonar dos camundongos estudados não apresentaram diferença significativa no decorrer da infecção, exceto com 15 dias de infecção, onde se observou mais granulomas nos pulmões do camundongo IFN- $\gamma$ <sup>+/+</sup> que nos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Isso sugere a importância do IFN- $\gamma$  no controle da infecção, em períodos iniciais, como tem sido descrito por outros autores (Appelberg, 1994; Chensue, 1995; Dalton, 2000; Kauffman, 1993). Ao contrário do parênquima hepático, no pulmão nota-se um progressivo aumento do percentual da área ocupada pelas lesões granulomatosas, isso também foi demonstrado por Orrell e colaboradores (Orrell et al, 1992).

Ao nível da composição celular dos granulomas pulmonares em 100 dias de infecção apresentam diferenças entre os dois grupos de camundongos. A presença do IFN- $\gamma$ , no grupo controle, aparentemente, induz maior presença de células epitelióides (macrófagos ativados) no centro dos granulomas, as quais não foram observadas nos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ . Mais uma vez, esta citocina pode ser importante também na diferenciação de macrófagos em células epitelióides que compõem o granuloma.

Dalton et al (1993) e Kamijo et al (1993) infectaram, com *M. bovis*, camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  ou do seu receptor, respectivamente, e não observaram necrose caseosa central intensa. Kamijo et al (1993) avaliaram o soro dos camundongos deficientes dos gens responsáveis pela síntese do receptor de IFN- $\gamma$  infectados com BCG e observaram que estes continham 100 vezes menos TNF- $\alpha$  após 2 horas de estímulo com LPS (lipolissacarídeo), do que no soro de camundongos que sintetizam níveis normais do receptor para IFN- $\gamma$ . Como o TNF- $\alpha$

tem sido associado à formação de necrose caseosa, a possível falta desta citocina nos animais deficiente de IFN- $\gamma$  impede a formação da necrose caseosa.

É possível que nas infecções por *M. bovis*, o IFN- $\gamma$  tenha um papel maior que em infecções por *M. tuberculosis*, desenvolvendo um efeito sinérgico com o TNF- $\alpha$  para levá-lo à necrose caseosa.

Os resultados obtidos com a quantificação da carga bacilar, associado aos achados histopatológicos e morfométricos sugerem que o IFN- $\gamma$  tem um papel mais relevante no tecido hepático que no pulmonar. Outras citocinas, possivelmente, podem compensar a ausência do IFN- $\gamma$  nos pulmões.

Além do conhecido papel do IFN- $\gamma$  na atividade micobactericida, demonstrou-se, no presente estudo, a importância desta citocina para o rápido desenvolvimento da resposta granulomatosa em resposta à infecção por *M. bovis*. Ainda relevante neste material é a clara demonstração que nos pulmões, a ausência do IFN- $\gamma$  é compensada, mais facilmente, que no fígado. Estas diferenças, indicativas de distinções no ambiente das citocinas e imuno-regulação, nestes dois órgãos, merece maior investigação.

## 7. CONCLUSÕES

---

Pelos nossos achados:

1. Animais IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentam maior carga bacilar, tanto no fígado e no pulmão, comparando com os animais IFN- $\gamma^{+/+}$ ;
2. Nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ , a carga bacilar foi maior no fígado que nos pulmões durante todo o período estudado, enquanto nos camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$  a carga bacilar foi maior no fígado que nos pulmões apenas no primeiro ponto estudado (15 dias);
3. Ambos o início e a resolução do processo inflamatório ocorreram mais tardiamente no fígado dos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  do que nos camundongos IFN- $\gamma^{+/+}$ .

Concluimos que:

1. O IFN- $\gamma$  é necessário para o controle da infecção por *M. bovis*;
2. O IFN- $\gamma$  participa da reação granulomatosa, acelerando a sua formação;
3. O IFN- $\gamma$  torna a reação granulomatosa mais efetiva na redução da carga bacilar, resultando na resolução mais precoce do processo inflamatório;
4. O papel imunoprotetor do IFN- $\gamma$  contra o *M. bovis* é mais pronunciado no fígado que nos pulmões.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ACTOR, J. K.; OLSEN, M.; JAGANNATH, C.; HUNTER, R. L. Relationship of survival, organism containment, and granuloma formation in acute murine tuberculosis. **J. Interferon Cytokine**, 19:1183-1193, 1999.

ANDRADE, Z. A.; SILVA, L. M.; DE SOUZA, M. M.; SADIGURSKY, M.; BARBOSA JR, A.; DE OLIVEIRA I. R. Role of the spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 59:557-562, 1998.

ANONYMOUS. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): memorandum from a WHO meeting (with the participation of FAO). **Bull. World Health Organ**, 72: 851-857, 1994.

APPELBERG, R.; CASTRO, A G.; PEDROSA, J.; SILVA, A. R.; 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.**, 62:3962-3971, 1994.

BABA, T.; NATSUHARA, Y.; KANEDA, K.; YANO, I. Granuloma formation activity and mycolic acid composition of mycobacterial cord factor. **Cell. Mol. Life. Sci.**, 53:227-232, 1997.

BANCROFT, G. J.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the scid mouse. **Immunol. Rev.**, **124**:5-24, 1991.

BANCROFT, G. J.; SHEEHAN, K. C.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Tumor necrosis factor is involved in the T-cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. **J. Immunol.**, **143**:127-130, 1989.

BARNES, P. F.; ABRAMS, J. S.; LU, S.; SIELING, P. A.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive. **Infect. Immun.**, **61**:3482-3489, 1993a.

BARNES, P. F.; ABRAMS, J. S.; WANG, E.; YAMAMURA, M.; MODLIN, R. L. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis T-cell clones. **Infect. Immun.**, **61**:197-203, 1993b.

BARNES, P. F.; MISTRY, S. D.; COOPER, C. L.; PIRMEZ, C.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Compartmentalization of a CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subpopulation in tuberculous pleuritis. **J. Immunol.**, **142**:1114-1119, 1989.

BARNES, P. F.; MODLIN, R. L.; ELLNER, J.J. T-cell responses and cytokines. In: BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 25, p. 417-436.

BOLIN, C. A.; WHIPPLE, D. L.; KHANNA, K. V. Infection of swine with *Mycobacterium bovis* as a human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, **176**:1559-1566, 1997.

BRITO T.; FRANCO, M. F. Granulomatous Inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **36**:185-192, 1994.

BUCHMEIER, N.A.; SCHREIBER, R.D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **82**:7404-7408, 1985.

CADRANEL, J.; GARABEDIAN, M.; MILLERON, B.; GUILLOZO, H.; AKOUN, G.; HANCE, A. J. 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>2</sub> production by lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis. **J. Clin. Invest.**, **85**:1588-1593, 1990.

CASANOVA, J.L.; JOUANGUY, E.; LAMHAMED, S.; BLANCHE, S.; FISCHER, A. Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. **Lacet**, **26**:581, 1995.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R. S.; BLOOM, B. R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J. Exp. Med.**, **175**:1111-1122, 1992.

CHATTRJEE, D.; ROBERTS, A. D.; LOWELL, K.; BRENNAN, P. J.; ORME, I. M. Structure basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infect. Immun.**, **60**:1249-1253, 1992.



CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; ALLENSPACH, E. J.; LU, B.; GERARD, C.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N.; Differential expression and cross-regulation function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. **J. Immunol.**, **163**:165-173, 1999.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J. H.; LINCOLN, P.; KUNKEL, S. L. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10, and TNF. **J. Immunol.**, **154**:5969-5976, 1995.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J. H.; LUKACS, N.; KUNKEL, S. L. Mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation in IFN- $\gamma$  and IL-4 knockout mice. **J. Immunol.**, **159**:3565-3573, 1997b.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J. H.; N.; KUNKEL, S. L. Effect of slow release IL-12 and IL-10 on inflammation, local macrophages function and the regional lymphoid response during mycobacterial (Th1) and schistosomal (Th2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. **Inflamm. Res.**, **46**:86-92, 1997a.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J. H.; SANGHI, P. S.; LINCOLN, P.; KUNKEL, S. L. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. **J. Immunol.**, **157**:4602-4608, 1996.

COLLINS, F.; MONTALBINE, V. Distribution of mycobacteria grown in vivo in the organs of intravenously infected mice. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **133**:281-286, 1976.

COLLINS, F.; STOKES, R.W. *Mycobacterium avium* complex infections in normal and immunodeficient mice. **Tubercle**, **68**:127-136, 1987.

COLLINS, F.; YATES, M. D. Low incidence of rifampicin-resistance tubercle bacilli. **Thorax**, **37**:526-527, 1982.

CONVERSE, P. J.; DANNENBERG JR, A. M.; ESTEP, J. E.; SUGISAKI, K.; ABE, Y.; SCHOFIELD, B. H.; PITT, M. L. Cavitory tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercule bacilli. **Infect. Immun.**, **64**:4776-4787, 1996.

COOPER, A. M.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; GRIFFIN, J. P.; RUSSEL, D. G.; ORME, I. M. Disseminated tuberculosis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, **178**:2242-2248, 1993.

COOPER, A. M.; FLYNN, J. L. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**:512-516, 1995.

COUTINHO, E. M.; DE SOUZA, M. M.; SILVA, L. M.; CAVALCANTI, C. L.; ARAÚJO, R. E.; BARBOSA JR, A. A.; CHEEVER, A. W.; ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of shistosomal 'pipestem' fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of 'pipestem' fibrosis in mice. **Int. J. Exp. Path.**, **78**:337-342, 1997.

CRRE, I. A.; SRINIVASAN, T.; KRISHNAN, S. A. R.; GARDINER, C. A.; MEHTA, J.; FISHER, C. A.; BECK, J. S. Reproducibility of histology in leprosy lesions. **Int. J. Leprosy**, **56**:296-301, 1988.

DALTON, D. K.; HAYNES, L.; CHU, C. Q. SWAIN, S. L.; WITTMER, S. Interferon- $\gamma$  eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J. Exp. Med.**, **192**:117-22, 2000.

DALTON, D. K.; PITTS-MEEK, S.; KESHAV, S.; FIGARI, I. S.; BRADLEY, A.; STEWART, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. **Science**, **259**:1739-1742, 1993.

DANNENBERG JUNIOR, A. M. ; ROOK, G. A. W. Patogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses - Dual Mechanisms that control bacillary multiplication. In: \_\_\_\_\_. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 27, p. 459-484.

DE LIBERO, G.; FLESH, I.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacteria-reactive Lyt-2<sup>+</sup> T cell lines. **Eur. J. Immunol.**, **18**:59-66, 1988.

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

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**:4822-4831, 1997.

DUNN, P.L.; NORTH, R. J., Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and ***Mycobacterium bovis*** strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. **Infect. Immun.**, **63**:3428-3437, 1995.

EHLERS, S.; BENINI, J.; KUTSCH, S.; ENDRES, R.; RIETSCHER, E. T.; PFEFFER, K. Fatal granuloma necrosis without exacerbated micobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p 55 gene deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, **67**:3571-3579, 1999.

EHLERS, S.; KUTSCH, S.; EHLERS, E. M.; BENINI, J.; PFEFFER, K. Lethal granuloma disintegration in micobacteria-infected TNFRp55<sup>-/-</sup> mice in dependent on T cells and IL-12. **J. Immunol.**, **165**:483-491, 2000.

EMMERICH, F.; THOLE, J.; EMBDEN, J.; KAUFMANN, S.H.E. A recombinant 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens. **J. Exp. Med.**, **163**:1024-1029, 1986.

FERRARA, J. L. M. Cytokines and the regulation of tolerance. **J. Clin. Invest.**, **105**:1043-1044, 2000.

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

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

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; BLOOM, B. R. An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, **178**:2249-2254, 1993.

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**: 561-572, 1995.

FOLLOWS, G. A.; MUNK, M. E.; GATRILL, A. J.; CONRADT, P.; KAUFMANN, S. H. E. Gamma interferon and interleukin-2, but not interleukin-4, are detectable in  $\gamma/\delta$  T-cell cultures after activation with bacteria. **Infect. Immun.**, **60**:1229-1231, 1992.

FONG, T. A. T.; MOSMANN, T. R. The role of IFN- $\gamma$  in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, **143**:2887-2893, 1989.

GARCIA, I.; GULER, R.; VESIN, D.; OLLEROS, M.; VASSALI, P; CHVATCHKO, Y.; JACOBS, M.; RYFFEL, B. Lethal *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice: cell-mediated immunity requires nitric oxide syntase 2. **Lab. Invest.**, **80**:1385-1397, 2000.

GARCIA, I.; MIYAZAKI, Y.; MARCHAL, G.; LESSLAUER, W.; VASSALI, P.  
High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to  
mycobacterial infections: synergistic action of TNF and INF- $\gamma$  in the  
differentiation of protective granulomas. **Eur. J. Immunol.**, **27**:3182-3190,  
1997.

GORDON, S.; COHN, Z. A. Bacille Calmette-Guérin infection in the mouse.  
Regulation of macrophage plasminogen activator by T lymphocytes and  
specific antigen. **J. Exp. Med.**, **147**:1175-1188, 1978.

GORDON, S.; KESHAV, S.; STEIN, M. BCG-induced granuloma formation in  
murine tissues. **Immunobiology**, **191**:369-377, 1994.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis*  
infection. **Vet. Microbiol.**, **40**:137-151, 1994.

HÄNSCH, H. C. R.; SMITH, D. A.; MIELKE, M. E. A.; HAHN, H.; BANCROFT,  
G. J.; EHLERS, S. Mechanisms of granuloma formation in murine  
*Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4<sup>+</sup> T cells. **Int.**  
**Immunol.**, **8**:1299, 1996.

HOGAN, L. M.; MARKOFSKI, W.; BOCK, A.; BARGER, B.; MORRISSEY, J.  
D.; SANDOR, M. *Mycobacterium bovis* BCG-induced granuloma formation  
depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28.  
**Infect. Immun.**, **69**:2596-2603, 2001.

HUANG, S.; HENDRIKS, W.; ALTHAGE, A.; HEMMI, S.; BLUETHMANN, H.; KAMIJO, R.; VILCEK, J.; ZINKERNAGEL, R. M.; AGUET, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. **Science**, **259**:1742-1745, 1993.

IVANYI J.; THOLE JELLE. Specificity and function of T- and B- cell recognition in tuberculosis. In: BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press, 1994. cap.26, p. 437-458.

JOUANGUY, E.; DÖFFINGER, R.; DUPUIS, S.; PALLIER, A.; ALTARE, F.; CASANOVA, J. L. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. **Curr. Opin. Immunol.**, **11**:346-351, 1999.

KAMIJO, R.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; GREEN, S.J.; AGUET, M.; LE, J.; VILCEK, J. Generation of nitric oxide and clearance of interferon- $\gamma$  after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. **J. Inflamm.**, **46**:23-31, 1996.

KAMIJO, R.; LE, J.; SHAPIRO, D.; HAVELL, E. A.; HUANG, S.; AGUET, M.; BOSLAND, M.; VILCEK, J. Mice that the interferon- $\gamma$  receptor have profoundly altered responses to subsequent challenge with lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, **178**:1435-1440, 1993.

KANEKO, H.; YAMADA, H.; MIZUNO, S.; UDAGAWA, T.; KAZUMI, Y.; SEKIKAWA, K.; SUGAWARA, I. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor- $\alpha$ -deficient mice. **Lab. Invest.**, **79**:379-386, 1999.

KAUFMANN, S. H.; FLESH, I. E. A. Cytokines in antibacterial resistance: possible application for immunomodulation. **Lung**, 168:1025-1032, 1990. suplemento.

KAUFMANN, S. H.; FLESH, I. E. Function and antigen recognition pattern of L3T4+ T-cell clones from *Mycobacterium tuberculosis*-immune mice. **Infect. Immun.**, 54:291-296, 1986.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, 11:129-163, 1993.

KAUFMANN, S. H.; LADEL, C. H. Role of T cells subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* BCG. **Immunobiology**, 191:509-519, 1994.

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana do origem bovino y salud publicca. **Rev. Sci. Tech. O.I.E.**, 3:55-76, 1984.

KLINDER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALI, P. The induction role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, 56:731-740, 1989.

KOHNO, K.; KATAOKA, J.; OHTSUKI, T.; SUEMOTO, Y.; OKAMOTO, I.; USUI, M.; IKADA, M.; KURIMOTO, M. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exert its effect independently of IL-12. **J. Immunol.**, 158:1541-1550, 1997 .



LADEL, C. H.; DAUGELAT, S.; KAUFMANN, S. H. E. Immune response to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. **Eur. J. Immunol.**, **25**:377-384, 1995a.

LADEL, C. H.; HESS, J.; DAUGELAT, S.; MOMBAERTS, P.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S. H. E. Contribution of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes to immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. **Eur. J. Immunol.**, **25**:838-846, 1995b.

LAGRANDERIE, M. R. R.; BALAZUC, A. M.; DERIAUD, E.; LECLERC, C. D.; GHEORGHUI, M. Comparasion of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. **Infect. Immun.**, **64**:1-9, 1996.

LONNEMANN, G.; SHAPIRO, L.; ENGLER-BLUM, G.; MÜLLER, G. A.; KOCH, K. M.; DINARELLO, C. A. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. **Kidney Int.**, **47**: 837-844, 1995.

MAEDA, J.; UEKI, N.; OHKAWA, T.; IWAHASHI, N.; NAKANO, T.; HADA, T.; HIGASHINO, K. Local production and localization of transforming growth factor- $\beta$  in tuberculous pleurisy. **Clin. Exp. Immunol.**, **92**:32-38, 1993.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 37:161-176, 1995.

McILROY, S. G.; NEIL, S. D.; McCracken, R. M. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. **Vet. Rec.**, 118:718-721, 1986.

McMURRAY, D. N.; COLLINS, F. M.; DANNENBERG JR, A. M.; SMITH, D.W. Pathogenesis of experimental tuberculosis in models animal. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 215:157-179, 1996.

MOLLOY, A.; MEYN, P. A.; SMIYH, K. D.; KAPLAN, G. Recognition and destruction of bacillus Calmette-Guérin-infected human monocytes. **J. Exp. Med.**, 177:1691-1698, 1993.

MORENO, C.; TAVERNE, J.; MEHLERT, A.; BATE, C. A.; BREALEY, R. J.; MEAGER, A.; ROOK, G. A.; PLAYFAIR, J. H. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induce the production of tumor necrosis factor from human and murine macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, 76: 240-245, 1989.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. **Vet. Microbiol.**, 40:153-177, 1994.

MORSON, B. C.; DAWSON, I. M. P. Inflammatory Disorders. In: \_\_\_\_\_ **Gastrointestinal Pathology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1974. cap. 20, p. 243-298.

- MUNK, M. E.; EMOTO, M. Function of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. **Eur. Respir. J.**, **20**:668s-775s, 1995. Supplemento.
- MUNK, M. E.; GATRIL, A.; KAUFMANN, S. H. E. Target cell lysine and interleukin-2 secretion by  $\gamma/\delta$  T lymphocytes after activation with bacteria. **J. Immunol.**, **145**:2434-2439, 1990.
- NAU, G. J.; LIAW, L.; CHUPP, G. L.; BERMAN, J. S.; HOGAN, B. L. M.; YOUNG, R. A. Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. **Infect. Immun.**, **67**:4223-4230, 1999.
- NIBBERING, P. H.; VAN DER HEIDE, G. A.; VAN FURTH, R. Immunocytochemical analysis of cellular responses to BCG. **Clin. Exp. Immunol.**, **75**:147-154, 1989.
- NORTH R. J.; IZZO, A. A. Granuloma formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice in response to progressive BCG infection. **Am. J. Pathol.**, **142**:1959-1966, 1993.
- NORTH, R.J. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. **J. Infect. Dis.**, **172**: 1550-1553, 1995.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. I. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: review. **Tuber. Lung Dis.**, **76**:1-46, 1995.

ORREL, J. M.; BRETT, S. J.; IVANYI, J.; COGHILL, G.; GRANT, A.; SWANSON BECK, J. Morphometric analysis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice suggests a genetic influence on the generation of the granulomatous inflammatory response. **J. Pathol.**, 166:77-82, 1992.

ORME, I. M.; COOPER, A. M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. **Immunol. Today**, 20:307-312, 1999.

PEDROSA, A. J.; SAUDERS, B. M.; APPERBERG, R.; ORME, I. M.; SILVA, M. T.; COOPER, A. M. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. **Infect. Immun.**, 68:577-583, 2000.

PEREZ, R. L.; ROMAN, J.; ROSER, S.; LITTLE, C.; OLSEN, M.; INDRIGO, J.; HUNTER, R. L.; ACTOR, J. K.; Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. **J. Interf. Cytokine Res.**, 20:795-804, 2000.

PETERS, M.; VIERLING, J.; GERSHWIN, M. E.; MILICH, D.; CHISARI, F. V.; HOOFNAGLE, J. H. Immunology and the liver. **Hepatology**, 13:977-994, 1991.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **J. Comp. Pathol.**, 99:357-399, 1988.

ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; BAUMGART, K.; RATHJEN, D. A.; BRITTON, W. J. Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo. **Infect. Immun.**, 67:5473-5476, 1999.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J. Immunol.**, 168:4620-7, 2002.

ROCH, F.; BACH, M. A. Strain differences in mouse cellular responses to *Mycobacterium lepraemurium* and BCG subcutaneous infections. II. Production of Interleukins 2, 4, and 6 and of interferon-gamma by draining lymph node cells. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 60:443-454, 1991.

ROOK, G. A.; AINSWORTH, S. W.; 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**, 59:333-338, 1986.

ROOK, G. A.; BLOOM, B. R. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. In: BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 28, p. 485-502.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Rev. Ciên. Farm.**, 18:101-108, 1997.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arq. Inst. Biol.**, 63:91-97, 1996.

SANTOS, R. DE O.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Dynamics of fibrosis production and resorption in intestinal schistosomiasis of mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**:25-31, 1992.

SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Retraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. **Immunol. Cell Biol.**, **78**:334-341, 2000a.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A., ORME, I. M.; COOPER, A. M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect. Immun.**, **68**:3322-3326, 2000b.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A., ORME, I. M.; Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, **98**:324-328, 1999.

SENALDI, G.; SHAKLEE, C. L.; MAK, T. W.; ULICH, T. R. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin-induced granuloma formation in mice lacking CD4 and CD8. **Cell. Immunol.**, **193**:155-161, 1999.

SENALDI, G.; YIN, S.; SHAKLEE, C. L.; PIGUET, P.; MAK, T. W.; ULICH, T. R. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. **J. Immunol.**, **157**:5022-5026, 1996.

SILVA, L. M. **Modulação do Granuloma Esquistossomótico: morfometria e Comportamento da Matriz Extracelular.** 1998. 87f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Univesidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Salvador.

SMITH, R. A.; HÄNSCH, H.; BANCROFT, G.; EHLERS, S. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. **Immunology**, **92**:413-421, 1997.

SMITH, R. A.; KREEGER, J. M.; ALVAREZ, A. J.; GOIN, J. C.; DAVIS, W. C.; WHIPPLE, D. L.; ESTES, D. M. Role of CD8<sup>+</sup> and WC-1<sup>+</sup>  $\gamma/\delta$  T cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bo mouse. **J. Leukoc. Biol.**, **65**:28-34, 1999.

STEEL, J. H.; RANNEY, A F. Animal tuberculosis. **Am. Rev. Tuberc.**, **77**:908-922, 1958.

VIDAL, M. R. F.; BARBOSA JR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Experimental pulmonary schistosomiasis: lack of morphological evidence of modulation in schistosomal pulmonary granulomas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35**:423-429, 1993.

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-Guérin in IL-12-deficient mice. **J. Immunol.**, **160**:6101-6111, 1998.

WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopie cytology. **Int. Rev. Cytol.**, 26:235-302, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva, 1993. 27p. (Nota Técnica 130).

YAMADA, H.; MIZUMO, S.; HORAI, R.; IWAKURA, Y.; SUGAWARA, I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1  $\alpha/\beta$  double-knockout mice. **Lab. Invest.**, 80:759-767, 2000.

YANG, J.; MITSUYAMA, M. An essential role for endogenous interferon- $\gamma$  in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. **Immunology**, 91:529-355, 1997.