



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

**ESTUDO MORFOLÓGICO IN SITU DA RESPOSTA
IMUNO-INFLAMATÓRIA NA TUBERCULOSE
PULMONAR HUMANA**

ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA

Salvador - Bahia - Brasil

2003



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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

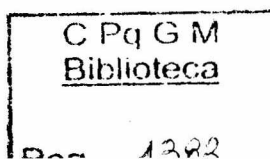
Dissertação de Mestrado

**ESTUDO MORFOLÓGICO IN SITU DA RESPOSTA
IMUNO-INFLAMATÓRIA NA TUBERCULOSE PULMONAR HUMANA**

ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA

Orientador : Manoel Barral-Netto

**Dissertação apresentada para obtenção
de grau de Mestre em Patologia, área
de concentração em Patologia Humana.**



Salvador - Bahia - Brasil
2003

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /
FIOCRUZ – Salvador - Bahia

D413e De Noronha, Almério Libório Lopes

Estudo morfológico *In Situ* da resposta imuno-inflamatória na tuberculose
pulmonar humana [manuscrito] / por Almério Libório Lopes de Noronha. –
2003.

160 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade
de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2003.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barral-Netto, Laboratório Integrado de
Microbiologia e Imuno-regulação.

1. Tuberculose. 2. Autopsia. 3. Granuloma. 4. SIDA. 5. Patologia.

I. Título.

CDU 616.24-002.5:577.27

1911
010124
2003


616 24-002.5:577.27

ESTUDO MORFOLÓGICO DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA IN SITU NA
TUBERCULOSE PULMONAR HUMANA

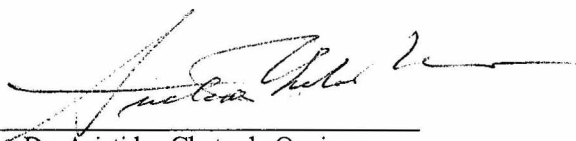
ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

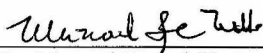
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho
Professor Adjunto
FAMED - UFBA



Dr. Aristides Cheto de Queiroz
Professor Titular
FAMED - UFBA



Dr. Manoel Barral-Netto
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

“ ... comecei a pensar que eu me organizando, posso desorganizar e que eu desorganizando posso me organizar.”

Chico Science

Este trabalho contou com a colaboração da Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Manoel Barral-Netto, pela orientação criteriosa , objetiva e dinâmica fundamentada em sólido conhecimento científico e numa didática atual

Ao Dr. Sérgio Arruda pela co-orientação e incentivo

A Dra. Tânia Correia, na orientação e realização das reações imunohistoquímicas cujo amplo conhecimento técnico em muito contribuíram para o meu enriquecimento científico e aprendizado específicos nessa área.

A Dra. Aldina Barral pelo incentivo e colaboração .

Ao Dr. Luciano Espinheira que sempre me incentivou a concluir este trabalho.

A Maria das Graças que me ajudou muito nas primeiras reações imunohistoquímicas

A Lourdes, grande técnica em anatomia patológica e minha amiga que realizou todos os cortes e recortes e colorações especiais nos blocos de parafina escolhidos para o estudo.

A todos os funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do HUPES, que de alguma forma me auxiliaram na realização do trabalho, em especial a José Carlos , Gerson e Eliomar .

A Dona Rosália e Mara que acompanharam de perto as etapas vencidas cobrando os prazos e colocando-se sempre a disposição para ajudar.

Aos Funcionários da biblioteca sempre a postos e dispostos a ajudar e em especial a Ana Maria Fiscina V. Sampaio, bibliotecária do CPqGM, pela normalização desta dissertação e revisão das referências bibliográficas.

À dupla do LIMI / LIP Silvia e José Carlos. Muito obrigado!

A todas as pessoas que não foram aqui citadas e que de alguma maneira contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas de turma do mestrado , companheiros de angústia e alegrias que ocorreram nesses dois anos, em especial Lucas , Elves e Isadora.

Aos meus pais e aos meus filhos Maria Alícia, Úrsula e Almério Filho que são o meu maior incentivo.

A Renatinha.

A Fiocruz / UFBA.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE	II
AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	1
1.2 O GRANULOMA	8
1.3 O SISTEMA IMUNE	11
1.4 ASSOCIAÇÃO HIV / TB	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 JUSTIFICATIVAS	17
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS AUTÓPSIAS	19
4.2 ESTUDO HISTOLÓGICO	20
4.3 ESTUDO HIMUNOHISTOQUÍMICO	20
4.4 TÉCNICA	21
4.5 CONTROLES	22
4.6 ANTICORPOS	23
4.7 INTERPRETAÇÃO	23

5 RESULTADOS	25
5.1 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	25
5.1.1 Figura 1	26
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO BACILO	29
5.2.1 Figura 2	30
5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA	31
5.3.1 Tnf- α	31
5.3.1.1 Figura 3	32
5.3.2 Tgf- β	33
5.3.2.1 Figura 4	34
5.3.3 Ifn- γ	35
5.3.3.1 Figura 5	36
6 DISCUSSÃO	37
6.1 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	37
6.1.1 Necrose	37
6.1.2 Arquitetura	38
6.1.3 Composição Celular	38
6.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	41
6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	43
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG –	Bacilo Calmette - Guérin
H – E –	Hematoxilina – Eosina
HIV –	Vírus da Imuno-deficiência Humana
HUPES –	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IFN - γ -	Interferon gama
IgG –	Imunoglobulina G
IL –	Inter – Leucina
IgG –	Imunoglobulina G
SIDA –	Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida
TB -	Tuberculose
TBS –	Solução Tris Salina Tamponada
TBSS –	Solução Tris Salina Tampopnada com Saponina
TGF - β -	Fator de Transformação do Crescimento beta
TNF - α -	Fator de Necrose Tumoral alfa
ARV -	Anti-retrovirais
Cels -	Células

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

GRÁFICO 1	5
GRÁFICO 2	6
GRÁFICO 3	6
TABELA 1	7
TABELA 2	19
TABELA 3	20
TABELA 4	28
TABELA 5	31
TABELA 6	31
DIAGRAMA 1	10
DIAGRAMA 2	13

RESUMO

ESTUDO MORFOLÓGICO *IN SITU* DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA NA TUBERCULOSE PULMONAR HUMANA. **ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA**. A tuberculose é uma doença antiga responsável pela morte de milhares de pessoas e que até hoje em dia não foi controlada. As alterações causadas pelo bacilo no organismo bem como os mecanismos imunológicos de defesa ainda estão sob intensa investigação pelo mundo. Apesar do volume de trabalhos científicos muito pouco se estuda em seres humanos com material de necrópsias. O objetivo do presente estudo é fazer uma correlação morfológica entre as lesões observadas em pacientes com tuberculose pulmonar, HIV + / HIV – contribuindo para o entendimento das interações entre células de defesa, bacilo e citocinas na resposta imuno-inflamatória que se monta, elucidando possíveis variações morfológicas destas lesões e os seus significados funcionais. Foram analisados ao microscópio óptico cortes histológicos de pacientes autopsiados no (HUPES) entre 1995 e 2001 com diagnóstico anátomo patológico de tuberculose pulmonar. O enfoque principal foram os granulomas ou lesões observadas nos cortes histológicos de pulmões dos casos selecionados onde além do H/E e Ziehl- Niels em foram feitas marcações imunohistoquímicas para IFN- γ , TNF- α e TGF- β . Os casos de cada grupo foram cuidadosamente selecionados excluindo-se aqueles que tivessem outra doença pulmonar que não tuberculose para evitar resultados falso positivos ou falso negativos pela presença de mais de um agente etiológico. Os resultados foram analisados por meio de tabelas algorítmicas vista por pelo menos três observadores onde foi feita a análise dos parâmetros morfológicos como a formação e modulação dos granulomas, a arquitetura e composição celular dos mesmos assim como a presença e extensão da necrose. Foi feito também uma avaliação das citocinas. Os resultados foram comparados e uma média dos valores foi utilizada no estudo. O grupo HIV + mostrou granulomas mal formados, com pouca ou nenhuma modulação, com extensas áreas de necrose e ainda com uma composição celular diferente onde predominam polimorfonucleares. No grupo HIV – o padrão de resposta imuno-inflamatória foi bastante diferente sendo observados granulomas bem formados com arquitetura preservada, variável quantidade de necrose e composto predominantemente por células mononucleares e com a presença de células epitelióides e células gigantes. Foram observadas também diferenças nos perfis de citocinas nas lesões que fogem ao que está descrito na literatura. Portanto existem padrões morfológicos diferentes para a tuberculose pulmonar humana quando se comparam pacientes HIV +/- HIV – e estas variações estão intimamente relacionadas ao estado da imunidade celular destes pacientes.

Palavras chaves: Tuberculose. Autopsia. Granuloma. SIDA.

ABSTRACT

MORFOLOGIC *IN SITU* STUDY OF THE IMMUNO-INFLAMMATORY RESPONSE IN HUMAN PULMONARY TUBERCULOSIS. ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA. Tuberculosis is an old existing disease, responsible for thousands' deaths and until nowadays has not been controlled. The changes caused in the organism by the bacillus as well as complete immunological defense's mechanisms are still under investigation. Although there are many *in vitro*'s scientific publications, we can rarely find works about human beings from the aspect of necropsy purely. The purpose of this study is making a morphologic relation between observed injuries in patients with pulmonary tuberculosis, HIV + / HIV – contributing for the understanding of the interaction between defense's cells, bacillus and cytokines resulted by the immuno-inflammatory response, demonstrating possible morphologic variations of these injuries and its functional meanings. Histological sections from autopsied patients presenting anatomy pathologic diagnosis in HUPES from 1995 to 2001, were analyzed by optical microscopy. The granulomas or injuries observed in lung's histological sections of cases selected that were submitted to H/E, Ziehl-Nielsen and immunohistochemistry reactions to IFN- γ , TNF- α and TGF- β were considered the focus of this study. Each group was carefully selected, excluding those cases that presented any other pulmonary disease rather than tuberculosis, avoiding false positive or false negative results by the occurrence of more than one etiologic agent. The results were analyzed through algorithmic tables, and the histologic sections were reviewed by at least three pathologists who considered morphologic changes like formation and immunological modulation of granulomas, the architecture, the cellular composition and the presence and extension of necrosis. It was made an evaluation of cytokines too. The results were evaluated and a medium value was adopted in the study. The HIV+ group showed poorly formed granulomas with little or none immunological modulation and extensive necrosis areas and a different cellular composition rich in polimorfonuclear cells. In the HIV – group the immuno-inflammatory response was completely different and it was observed typical granulomas with normal architecture, variable caseous necrosis and mainly composed by mononuclear cells. Epithelioid cells and giant cells were also found. In addition, the cytokine profiles observed were different from the literature's data. In conclusion, there are different morphological patterns to the human pulmonary tuberculosis when comparing HIV +/- HIV – patients and these variations are closely related to the cellular immunity state of them.

Key words: Tuberculosis. Autopsy. Granuloma. AIDS.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A tuberculose é uma das doenças mais antigas de que a humanidade tem conhecimento sendo responsável por epidemias históricas que causaram a morte de milhares de pessoas ao longo dos tempos. Até hoje em dia contudo , não se conseguiu controlar ou erradicar esta doença característica de regiões onde prevalecem a miséria e as diferenças sócio-econômicas mais gritantes sem discriminar sexo, raça, idade, religião ou classe social.

Os registros mais antigos da doença são de casos de tuberculose vertebral – Mal de Pott - datados de cerca de 8.000 AC (HERZOG, 1998). Outras evidências da doença podem ser comprovadas através de fósseis ósseos do período neolítico assim como em múmias egípcias com aspectos macroscópicos que sugerem fortemente a tuberculose óssea com data de 2.400 AC.

Outro achado histórico foi realizado em uma múmia de criança Inca extremamente bem preservada e apresentando um abscesso no músculo psoas ilíaco de onde foram identificados bacilos álcool-ácido resistentes, por volta de 700 AC. Há relatos no código de Hammurabi (1948 – 1905 AC) sobre uma doença pulmonar crônica, provavelmente referindo-se a tuberculose pulmonar (HERZOG, 1998).

Hipocrates (460-370AC) foi o primeiro a observar tuberculose em tecidos de animais com "Phthisis" pois na grécia antiga não se faziam autópsias em humanos. Na mesma época Aristóteles descreveu a "Scrofula" na pele de porcos com "Phtysis".

Do ponto de vista clínico tem-se o relato histórico da doença por um médico romano que viveu no 5^o século depois de cristo chamado "Caelius Aurelianus" que descreveu os aspectos clínicos mais relevantes da doença com uma observação e visão clínica impressionantes. Desde então, notou-se que a tuberculose era uma doença que aparecia em regiões urbanas onde se tinham aglomerações de pessoas em pequenos espaços como as do vale do rio Nilo. Talvez por esta razão não se tenham relatos desta doença na bíblia pois os textos bíblicos se passam na maioria das vezes em áreas rurais.

Na renascença, na segunda metade do século XIV teve início o estudo das alterações *post-mortem*, porém somente no século XVII, com a publicação da "ópera médica" de Sylvius de la Boë de Amsterdam é que surgiu o primeiro estudo detalhado das alterações anátomo patológicas desta doença de fato documentadas. O autor observou pela primeira vez que os granulomas, denominados "tubérculos" eram um achado constante nos pulmões e outros órgãos afetados pela doença. Ele também descreveu a progressão para cavidades pulmonares (HERZOG, 1998).

Até esta época existia uma polêmica quanto à forma de transmissão da doença que perduraria por alguns séculos até a identificação do bacilo por Robert Koch pois muitos dos estudiosos acreditavam, assim como Hipócrates, que se tratava de uma doença hereditária. Alguns ainda tentavam entender ou acreditar que era uma doença infecciosa porém não tinham como comprovar.

A despeito das investigações e estudos realizados ao longo da história, o fato concreto que se tinha era que a tuberculose era uma praga sem cura ou tratamento eficaz e que as pessoas que a contraissem fatalmente morreriam.

Contudo, em 1843 o alemão Philipp Klencke demonstrou experimentalmente a natureza infecciosa da tuberculose através da reprodução da doença em animais de laboratório inoculados por via intra-venosa com material retirado de um granuloma e observou que os animais morreram de tuberculose disseminada (HERZOG, 1998).

Coube a Robert Koch tanto a identificação do bacilo quanto a utilização de um extrato contendo bacilos denominado tuberculina para a identificação de pessoas infectadas. Após estas descobertas muitos estudiosos voltaram seus interesses para o tratamento surgindo concomitantemente sanatórios e técnicas cirúrgicas efetivas em curar os doentes com tuberculose. Posteriormente os franceses Calmette e Guérin descobriram e padronizaram a primeira vacina que se conhece para tuberculose - BCG - a qual passou a ser utilizada em crianças com alto risco de desenvolverem doença. Somente em 1943 padronizou-se na Califórnia a estreptomicina, surgindo posteriormente outras drogas que compõem o arsenal terapêutico contra o bacilo atualmente disponíveis.

O conhecimento destes aspectos históricos é fundamental para entendermos a importância desta entidade nosológica que assola a humanidade desde os tempos mais remotos e contra a qual vem sendo travada uma guerra científica no sentido de exterminá-la ou, pelo menos, impedir o seu avanço na proporção em que vemos hoje bastante semelhante àqueles tempos.

Três situações especiais são responsáveis pela incidência da tuberculose atualmente. A primeira diz respeito as condições sócio-econômicas e culturais que se observa nos países do terceiro e quarto mundos onde a miséria, a falta informação e de uma política eficaz de saúde pública favorecem o aumento do número de casos anualmente.

O segundo ponto é a epidemia de SIDA que piora muito a situação destas populações mas que também inclui os países desenvolvidos onde a doença parecia controlada até duas décadas atrás e que passaram a apresentar taxas de incidência crescentes desde então. Por último tem-se o aparecimento de cepas multirresistentes às drogas disponíveis atualmente como agravante deste quadro e que se deve em grande parte ao abandono precoce do tratamento pelo doente.

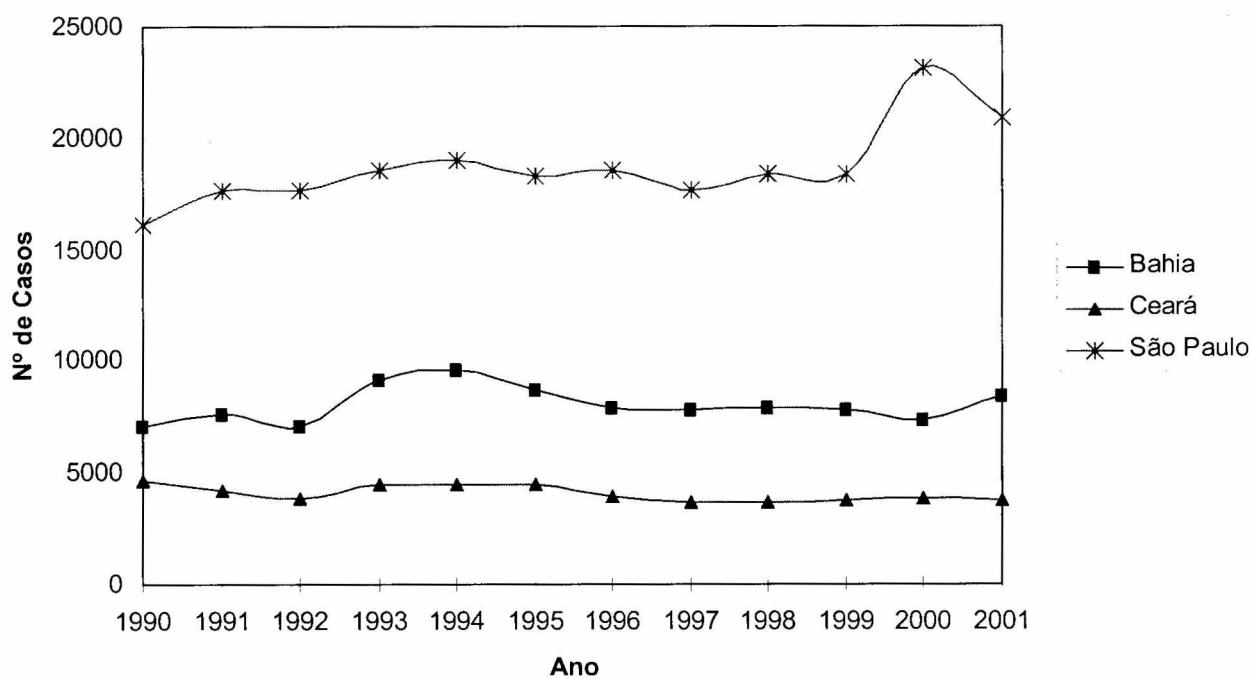
Em 2002 dados da OMS revelam uma estimativa de 8 a 9 milhões de novos casos de tuberculose no mundo com 3 milhões de óbitos. No Brasil estima-se a incidência de 124 mil casos por ano. (RUFFINO-NETO, 2002). Segundo dados do ministério da saúde - FUNASA - nos últimos vinte anos foram notificados cerca de 82.000 casos de tuberculose por ano em média no Brasil, o que está abaixo da projeção do SUS (RUFFINO-NETO, 2002). Porém os dados do Ministério se referem aos casos notificados oficialmente.

Entretanto a Funasa é a única fonte oficial de dados estatísticos da saúde pública Brasileira. Estes dados nos informam que o nosso estado da Bahia é o terceiro maior do Brasil em número de casos notificados de tuberculose com 8.000 casos anuais da doença perdendo apenas para o Rio de Janeiro (15.000 casos) e para São Paulo que é o grande campeão com uma média de 17.000 casos notificados anualmente.

Cabe aqui o comentário de que apesar de termos aproximadamente a metade do número de casos do estado de São Paulo a nossa população é cerca de três vezes menor o que pode significar uma taxa de incidência muito semelhante. No nordeste somos os campeões seguidos por Pernambuco e Ceará que notificam cerca de 4.000 casos por ano em média, o que representa a metade dos nossos casos.

Curiosamente não se ouve falar sobre tuberculose como um problema ativo de saúde pública na Bahia e mesmo no Brasil fazendo a maioria da população acreditar que ela está controlada ou mesmo que já foi erradicada. É nesta idéia que as pessoas acreditam e talvez por este tipo de cultura até os médicos que não trabalham diretamente com tuberculose deixem de pensar nela como possibilidade diagnóstica. Se somarmos a estes fatores as dificuldades diagnósticas estaremos sem dúvida aumentando as estatísticas apresentadas.

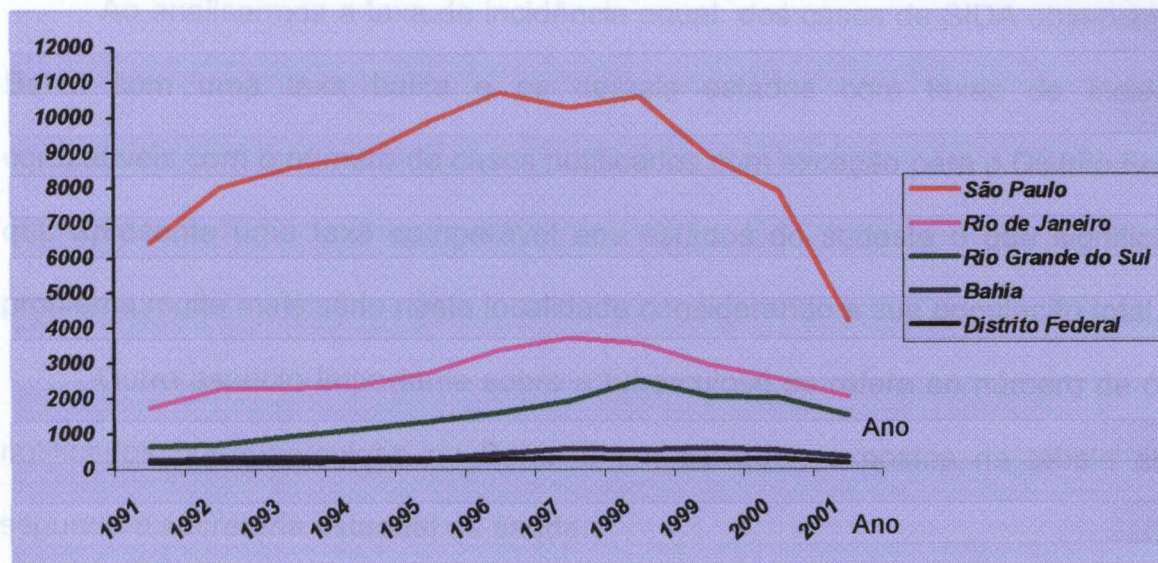
Os números apresentados no texto são melhor visualizados no gráfico a seguir:



Fonte: Ministério da Saúde/FUNASA

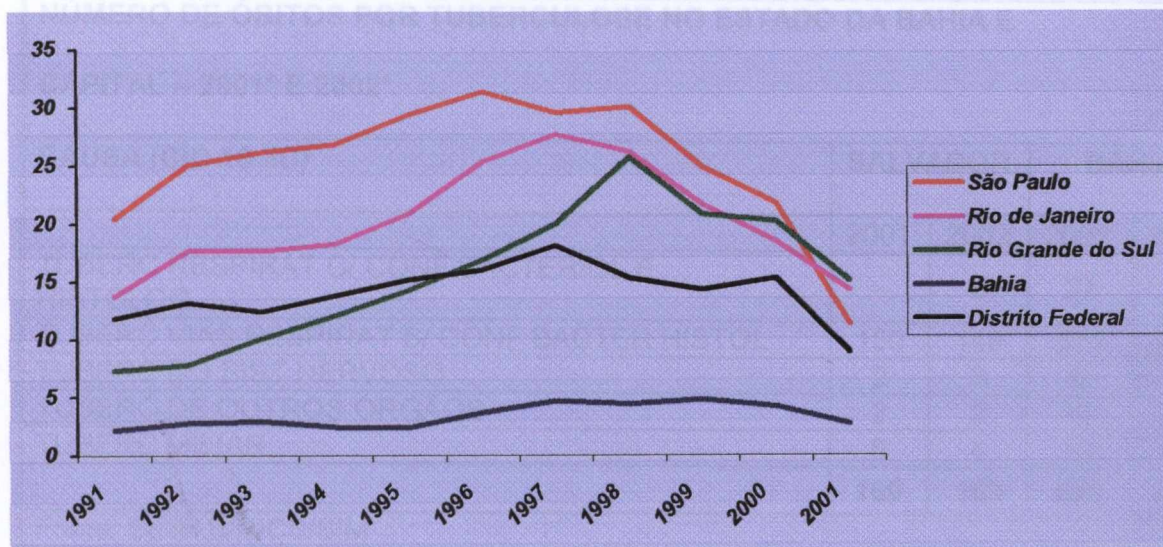
Quando analisamos os números referentes a SIDA notamos alguns aspectos curiosos melhor observados nos gráficos abaixo:

CASOS DE SIDA NO BRASIL



Fonte: Ministério da Saúde / FUNASA.

TAXA DE INCIDÊNCIA DE SIDA (por 100.000/hab.)



Fonte: Ministério da Saúde / FUNASA.

Através destes gráficos observamos no primeiro que a maior notificação de casos é nos estados do sudeste e no Rio Grande do Sul, vindo a Bahia e o Distrito Federal com números absolutos bem modestos quando comparados a estes estados.

Ao analisarmos a taxa de incidência anual dos casos de SIDA observamos a Bahia com uma taxa baixa e os demais estados com taxas de incidência compatíveis com o número de casos notificados com exceção para o Distrito Federal que apresenta uma taxa comparável aos estados do sudeste o que significa um problema muito mais sério nesta localidade considerando a sua população total.

Outro aspecto importante sobre a tuberculose se refere ao número de óbitos notificados por tuberculose na Bahia e em Salvador, expostos na tabela abaixo segundo a secretaria estadual de saúde.

Tabela 1: Número de óbitos por tuberculose no estado da Bahia e Capital

NÚMERO DE ÓBITOS POR TUBERCULOSE NO ESTADO DA BAHIA E CAPITAL – 2001* E 2002*				
CAUSA (CID 10 3C)	SALVADOR		BAHIA	
	2001	2002	2001	2002
TUBERC RESPIRAT C/ CONF BACTERIOL E HISTOLOG	-	5	27	89
TUBERC VIAS RESPIRAT S/ CONF BACTER HISTOL	150	149	371	344
TUBERC DO SIST NERVOSO	2	3	6	6
TUBERC DE OUTROS ÓRGÃOS	2	2	10	7
TUBERC MILIAR	6	4	11	11
	160	163	425	457
Fonte: SESAB/DICS/SIM				
* Elaborado com dados processados até 28/07/2003.				

Através da interpretação destes dados podemos observar que a grande maioria dos casos notificados de óbitos por tuberculose não têm confirmação histológica ou bacteriológica o que significa que o diagnóstico é exclusivamente clínico. Outra informação importante é a de que aproximadamente metade dos casos de óbito por tuberculose notificados na Bahia acontecem em Salvador.

Este dado deve ser melhor interpretado pois a primeira vista pode parecer que a maioria dos casos da doença estão na capital. Não temos entretanto dados da notificação da doença no interior do estado pois o diagnóstico sendo eminentemente clínico vai depender de uma triagem correta.

Deste modo observamos que o Brasil tem dois problemas sérios de saúde pública que exigem medidas eficazes de controle, educação, conscientização e tratamento pois atingem uma fatia da população em fase ativa economicamente o que poderá trazer a médio prazo conseqüências sérias para os setores econômico e social.

1.2 O GRANULOMA

Entende-se por granuloma a lesão morfológica constituída por uma coleção focal de células mononucleares predominantemente (macrófagos, células epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos) circundados por tecido conjuntivo que contém fibroblastos, fibras colágenas e vasos neo-formados além de monócitos recrutados da circulação sistêmica e linfócitos ocupando a periferia, vendo-se na área central desta lesão necrose caseosa. A única característica morfológica da inflamação granulomatosa é a ocorrência de células epitelióides e da aparência concêntrica da lesão como um todo (MARIANO 1995)

Histologicamente os granulomas são compostos por células epitelióides cercadas por uma zona de linfócitos e fibroblastos que usualmente contém células gigantes tipo Langhans. No centro das lesões usualmente está presente necrose caseosa. A quantidade é inteiramente dependente da reação de hipersensibilidade do paciente bem como da virulência do bacilo (ROBBINS, 2000).

A inflamação crônica granulomatosa não é exclusiva do bacilo da tuberculose embora seja característica deste agente, mas granulomas também podem ser observados em diversos tipos de patologias secundárias aos mais variados agentes etiológicos como o *S. mansoni*, o *P. brasiliensis*, o *H. capsulatum*, *Leishmania sp.* entre outros, porém a ocorrência de necrose do tipo caseosa é mais comum quando o agente é o *M. Tuberculosis* embora não seja exclusiva. Nestes casos os granulomas são denominados de epitelióides ou imunológicos, pois há sempre participação do sistema imune na sua modulação. Podem também ser secundários a presença de materiais sintéticos estranhos ao organismo como fios de sutura e talco entre outros, sendo então denominados de granulomas tipo corpo estranho.

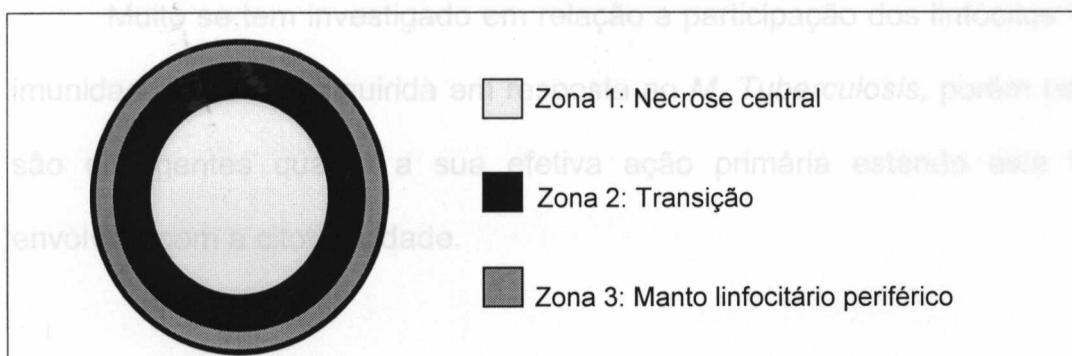
Os mecanismos envolvidos na formação das lesões granulomatosas são distintos bem como o seu comportamento biológico (DE BRITO & FRANCO, 1994). No que se refere ao comportamento biológico, sabe-se que a necrose caseosa é o resultado da destruição de células inflamatórias, bacilos e componentes da matriz extra-celular no momento da formação do granuloma pois ocorre fagocitose dos bacilos e liberação de enzimas lizossômicas e radicais livres de oxigênio e outros componentes do fagolisossomo no tecido conjuntivo e na matriz conjuntiva (ROBBINS, 2000).

1.3.0 Conforme mencionado acima, a resposta imune celular tem participação fundamental no comportamento biológico das lesões na tuberculose pois pela definição do Robbins (ROBBINS, 2000) a necrose é o produto da ação do sistema imune versus a virulência do bacilo.

Caracteristicamente não são observados neutrófilos ou outras células polimorfonucleares fazendo parte dos granulomas por definição. Tais células são observadas na resposta inflamatória aguda (ROBBINS, 2000).

Recentemente um grupo de pesquisadores sul-africanos (FENHALLS et. al., 2002), trabalhando com tecido pulmonar de pacientes operados por bronquiectasias e hemoptise secundárias à tuberculose, estudou e definiu melhor um aspecto interessante do granuloma já observado, porém nunca comprovado e que diz respeito a disposição arquitetural das células na lesão, quando devidamente modulada imunologicamente. Desta forma foram identificadas três áreas distintas no granuloma que têm correlação direta com a cinética e com a função celular no seu microambiente. Estas áreas são: área central de necrose caseosa (zona 1); uma zona intermediária com macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas (zona 2); e uma zona externa ou periférica representada por um manto de células linfocitárias (zona 3).

No diagrama abaixo podemos observar a representação esquemática destas zonas:



1.3 O SISTEMA IMUNE

A presença do *M. tuberculosis* no organismo de um hospedeiro hígido, desperta uma resposta inflamatória específica denominada granulomatosa (DE BRITO, 1994). O granuloma determinado pelo bacilo é classificado como imunológico pois envolve a modulação deste que se dá através de citocinas e células específicas.

Concomitantemente, ocorre a apresentação dos antígenos do *M. tuberculosis* aos linfócitos com ativação destas células, principalmente do sub-tipo T bem como dos macrófagos pela secreção de citocinas predominantemente do pólo Th1 da resposta imune celular como o IFN- γ e o TNF- α além de outras como IL-2, IL-12, IL-18 e IL-10.

Sabe-se que a formação e modulação imunológica do granuloma acontece com a participação dos linfócitos T CD4 + que secretam IFN- γ ativando os macrófagos.

Uma vez ativados estes macrófagos produzem TNF- α e outras citocinas (IL-1, IL-6, IL-12) bem como óxido nítrico que tem ação lítica sobre o bacilo aprisionado em vacúolos no seu citoplasma (ELNER 1997; CLEMENS et. al., 2002). As interações entre estes dois tipos celulares é que mantém o granuloma ativo e funcionando para eliminação do agente agressor e o resultado desta imunomodulação é o aparecimento de maior ou menor quantidade de necrose.

Muito se tem investigado em relação a participação dos linfócitos T CD8 + na imunidade inata ou adquirida em resposta ao *M. Tuberculosis*, porém os resultados são divergentes quanto a sua efetiva ação primária estando este tipo celular envolvido com a citotoxicidade.

Em situações especiais pode também secretar citocinas como a IL-12 ou TNF- α que induz apoptose das células alvo (SERBINA et. al., 2001; FENHALLS et. al., 2001).

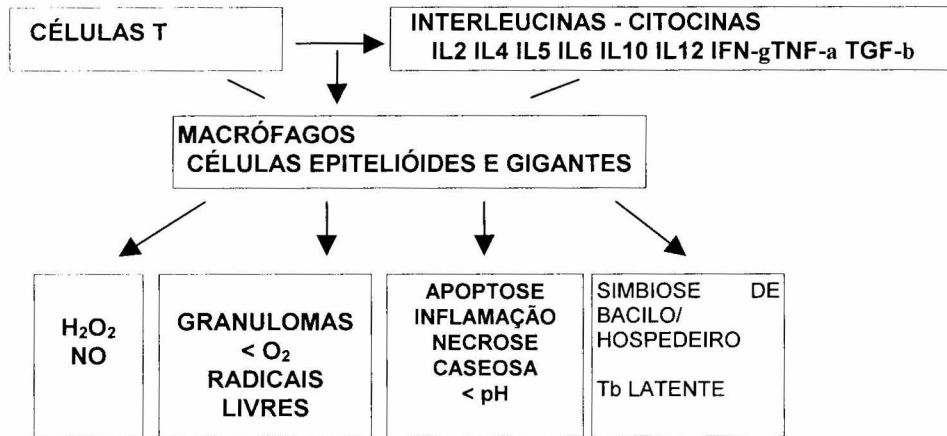
Basicamente tem-se a participação de células T CD8 + concomitantemente com as CD4+ contudo as suas interações entre si e com as outras células do granuloma não estão completamente elucidadas. Tal fato está sob intensa investigação atualmente pois há variações de resultados entre os pesquisadores quanto a presença de citocinas no sítio da lesão variando entre o pólo Th1 e o Th2 o que sugere uma não dicotomização tão nítida da resposta imune celular a depender da situação imunológica, da tensão de oxigênio presentes no local, além de fatores intrínsecos do hospedeiro e do bacilo (FENHALLS et al., 2002; ZHANG et al., 1995; SERBINA et al., 2001; VANKAYALAPATI et al., 2000; ELNER, 1997).

Estes trabalhos nos fazem refletir acerca da grande capacidade de adaptação do sistema imune frente a situações variadas utilizando vias alternativas e todo o arsenal de citocinas, células e quimiocinas disponíveis para o combate efetivo aos agentes agressores. Assim sendo, variações no estado imunológico do hospedeiro como observado em doenças auto-imunes, determinados tipos de câncer, secundárias ao uso de medicações quimioterápicas ou imunossupressoras além das infecções virais e desnutrição irão também comprometer a resposta normal do organismo e permitir tanto a reativação da tuberculose pulmonar quanto a sua disseminação pois, nestes casos, o equilíbrio estaria alterado em favor do bacilo.

Além disso a cada dia se conhece melhor o bacilo, seu genoma e as informações nele contidas o que favorece o conhecimento das suas adaptações a ambientes hostis com pouco oxigênio (FENHALLS et. al., 2002) o que significa que

deve-se ter uma visão mais globalizada da doença no que diz respeito às interações entre hospedeiro x bacilo pois está claro que o bacilo também evoluiu ao longo dos tempos e está sempre se adaptando. A ilustração abaixo resume o que ocorre com o sistema imune na presença do bacilo:

O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O BACILO



1.4 ASSOCIAÇÃO HIV / TB

Com o aparecimento da SIDA muito se tem estudado sobre a imunidade celular associada ao ressurgimento de doenças infecciosas como a Tuberculose (ELNER, 1997) já que o vírus é linfotrópico para células CD4 + (GASCON et. al., 2002) e vários autores demonstram a inter-relação entre a contagem de células CD4 + e a progressão da doença em proporções inversas. Além disso, constataram que quanto pior o estado clínico do paciente com SIDA menor o número de células CD4 + circulantes e pior a sua imunidade celular favorecendo o aparecimento de infecções oportunistas.

Muitas vezes esta diminuição específica se dá pelo aumento da apoptose destas células infectadas ou ativadas pelo vírus com a co-participação dos monócitos (GASCON et. al., 2002).

Após a introdução do moderno coquetel quimioterápico anti-retroviral observaram-se aspectos curiosos quando se estudam pacientes co-infectados com HIV / *M. tuberculosis* .

Os principais aspectos dizem respeito às interações entre os dois agentes etiológicos e parecem ser bidirecionais e importantes pois os pacientes que desenvolvem tuberculose no curso da SIDA apresentam formas clínicas mais graves e disseminadas da doença, frequentemente atípicas do ponto de vista histopatológico. Do mesmo modo o impacto da tuberculose nos pacientes HIV positivos parece favorecer a replicação viral pois, nesta situação, observam-se cargas virais altas no plasma por um fenômeno conhecido como transativação heteróloga do HIV. (ELNER, 1997; BRASIL, 2001). Outro aspecto curioso é o fato de que pacientes HIV+ que receberam tratamento anti-retroviral mostraram após pouco tempo aumento de células CD4+ de memória específicas para o *M.tuberculosis* que produzem IFN- γ no sangue periférico (HENGEL et. al., 2002).

Esta observação tem relação direta com a melhora clínica e diminuição da mortalidade destes pacientes e prova que estes agentes quimioterápicos específicos estimulam a expansão clonal de linfócitos T CD4 + por reduzirem consideravelmente a carga viral (HENGEL et. al., 2002; BRASIL, 2001). Há ainda relatos na literatura de que o tratamento isolado da tuberculose nos casos de co-infecção HIV- *M. tuberculosis* em pacientes que não estejam usando anti-retrovirais também reduz a carga viral nestas circunstâncias (BRASIL, 2001).

Portanto, constitui-se um desafio excitante tentar compreender um pouco mais sobre as manifestações das doenças no ser humano e as suas interações com o sistema imune quando observadas no local onde ocorrem, correlacionadas com a produção de citocinas e células da resposta imuno-inflamatória para tentar

esclarecer aspectos básicos que podem contribuir para melhor correlação clínica, bem como para a elaboração de estratégias de pesquisa com maior embasamento teórico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Comparar a morfologia das lesões observadas na tuberculose pulmonar em pacientes autopsiados HIV+ X HIV-, correlacionando-as com a participação das citocinas analisadas para avaliar variações da resposta imune .

2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar as variações morfológicas dos granulomas nos dois grupos analisados .
- Estabelecer uma correlação entre o padrão morfológico das lesões com a expressão das citocinas.
- Identificar o bacilo nos cortes histológicos através da coloração especial de Ziehl-Nielsen para tentar estabelecer uma correlação entre a sua presença com os demais critérios avaliados.

3 JUSTIFICATIVAS

A tuberculose é sem dúvida um grande problema de saúde pública mundial e está longe de ser resolvido ou controlado pois as variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas de uma maneira geral são muito grandes nos dois mundos economicamente existentes. É notório que vários centros de pesquisa do mundo estudam esta patologia com abordagens variadas como a análise de células em cultura e dosagem de substâncias em sobrenadantes do plasma. Um grande volume de publicações é baseado em modelos experimentais.

O enfoque em seres humanos, por questões éticas, é basicamente voltado para o tratamento clínico. Este também é um problema sério, visto que a cada dia surgem novas cepas do bacilo multi-resistentes às drogas disponíveis atualmente, contribuindo para o aumento dos casos de doença ativa. Nos países desenvolvidos as doenças imunodepressoras como a SIDA contribuem para este aumento, enquanto nos países em desenvolvimento as baixas condições sanitárias e sócio-econômicas é que ocupam lugar de destaque contribuindo para o aumento da incidência da tuberculose. Estes dois aspectos somados, favorecem o aparecimento de formas clínicas variadas e não usuais o que torna ainda mais difícil o diagnóstico laboratorial. Por outro lado os ensaios de vacinas contra o bacilo até agora realizados não mostraram proteção eficaz a longo prazo ou contra re-infecção o que demonstra que a tuberculose continua sendo um desafio para a ciência.

Dentre estas considerações, devemos enfatizar que a maioria dos trabalhos científicos com enfoque nos mecanismos imunológicos relacionados as interações bacilo x hospedeiro são realizados em modelos experimentais com pouca ênfase aos aspectos morfológicos. Se avaliarmos os que são feitos em humanos com esta mesma ênfase observamos uma grande redução no volume de publicações.

No campo puramente morfológico, como é o caso das autópsias, os trabalhos são antigos não sendo possível investigar a presença de determinadas substâncias como as citocinas no sítio da lesão até mesmo porque o conhecimento destas substâncias é relativamente recente. Portanto, a realização de um estudo basicamente morfológico que permita associar técnicas rápidas, de baixo custo relativo, exeqüíveis e específicas como o H-E e a imunohistoquímica utilizando material de autópsias de seres humanos disponível nos arquivos do serviço de anatomia patológica do hospital universitário, pode trazer informações interessantes e que por vezes passam despercebidas quando se utilizam outras metodologias.

Por outro lado a observação *in situ* pode trazer informações importantes que não são analisadas quando se estudam células ou em modelos experimentais já que no tecido humano pode-se observar as interações entre o bacilo e os seus constituintes mesenquimais, vasculares e epiteliais com a possibilidade de associação com aspectos da resposta imune com fidelidade e reprodutibilidade total dos resultados.

Deve ser ressaltado ainda, que os temas dos quais este estudo trata representam três grandes áreas de investigação científica mundial (SIDA, Tuberculose e Citocinas) e que a soma de conhecimentos pode trazer novas perspectivas e possibilidades de associação de métodos no sentido de elucidar os principais mecanismos patogênicos destas doenças.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS AUTÓPSIAS

Foram incluídos no presente estudo autópsias realizadas entre 1995 e 2001 no serviço de anatomia patológica do HUPES totalizando 35 que apresentaram diagnóstico anátomo-patológico de tuberculose pulmonar. Dentre estas autópsias encontram-se 22 casos HIV+ (positivo) bem como 13 casos HIV – (negativo) que foram então separados em dois grupos para comparação posterior dos resultados.

Do total de autópsias selecionadas foram excluídas aquelas em que o paciente apresentou mais de uma patologia pulmonar, devido a possibilidade de que os resultados não correspondam ao que estaria ocorrendo realmente no tecido quanto a análise das citocinas, principalmente no grupo HIV+, pois a maioria dos agentes de infecções oportunistas envolve a participação do sistema imune na sua patogenia assim como das outras patologias observadas no grupo HIV-. Com isso o total de autópsias ficou reduzido a 10 (dez) sendo 06 (seis) do grupo HIV+ e 04 (quatro) do grupo HIV- (Tab. 2). Dentre estes 10 casos, 06 são do sexo masculino e a média de idade foi de 34 anos.

TABELA 2: Comparação entre as autópsias selecionadas e as excluídas do estudo.

AUTÓPSIAS DO GRUPO HIV+		AUTÓPSIAS DO GRUPO HIV-	
BLOCOS NÃO LOCALIZADOS	03	BLOCOS NÃO LOCALIZADOS	04
RELATÓRIOS NÃO LOCALIZADOS	03	RELATÓRIOS NÃO LOCALIZADOS	02
SARCOMA DE KAPOSI PULMONAR	03	ONEUMONIA BACTERIANA	01
CITOMEGALOVÍRUS PULMONAR	02	LEUCEMIA MIELÓIDE PULMONAR	01
ASPERGILOSE PULMONAR	01	ADENOCARCINOMA MICROSCÓPICO	01
HISTOPLASMOSE PULMONAR	01	SELECIONADAS PARA O ESTUDO	04
CRIOCOCOSE PULMONAR	01	TOTAL	13
TOXOPLASMOSE PULMONAR	01		
PNEUMONIA BACTERIANA	01		
SELECIONADAS PARA O ESTUDO	06		
TOTAL	22		

4.2 ESTUDO HISTOLÓGICO

O estudo histológico das secções de tecido pulmonar foi realizado segundo a técnica habitual de inclusão em parafina. Os cortes foram obtidos a 5 μm e corados pelo método do H-E e pelo do Ziehl- Nielsen.

4.3 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Este estudo foi realizado em secções seriadas de 3 μm de espessura, obtidas dos blocos de parafina. As secções foram colhidas em lâminas tratadas com Poly-L-lisina (Sigma Diagnostic) para evitar descolamentos dos cortes durante as manipulações. As citocinas escolhidas para o estudo foram marcadas pela técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase e são as seguintes: o fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), o fator de transformação do crescimento-beta ($\text{TGF-}\beta$) e o interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$). Foram utilizados anticorpos policlonais para identificação destas citocinas, melhor discriminados conforme a Tabela 3.

TABELA 3: relação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica

ANTICORPO	CLONE	ESPECIFICIDADE	DILUIÇÃO	FORNECEDOR
ANTI-TNF- α	Policlonal	Fator de Necrose Tumoral-alfa	1:500	Genzyme
ANTI-IFN- γ	Policlonal	Interferon-gama	1:500	Genzyme
ANTI-TGF- β	Policlonal	Fator de Transformação do Crescimento-beta	1:200	Sta. Cruz Biotechnology

4.4 TÉCNICA

As secções histológicas, com espessura de 3 μm , foram desparafinizadas em três banhos de xilol, com duração de 10 minutos cada e em um banho de acetona de 5 minutos. Em seguida, foram efetuados dois banhos em álcool absoluto durante 5 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de álcool por 1 minuto em cada concentração (70%, 50% e 30%), lavadas em água corrente e destilada e estabilizadas em tampão TBS (Tris buffer saline - solução Tris salina tamponada). A exposição do antígeno, foi realizada como a seguir: o desmascaramento do antígeno (PIER) que em geral se refere aos métodos enzimáticos (proteases), aplicados com objetivo de melhorar a imunorreatividade dos tecidos, foi efetuado com Tripsina mais cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,1% por 30 minutos a 37°C.

Os cortes foram então lavados com TBS com saponina 0,1% (TBSS) para melhor permeabilização das membranas celulares já que as citocinas são intracitoplasmáticas predominantemente. Para inibição de reações inespecíficas, se fez uso de leite desnatado a 5% (Molico) diluído em TBSS, durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído em TBSS com 10% de soro AB e 1% de BSA a 10%, incubado em câmara úmida durante uma noite a 4°C, conforme diluições discriminadas na tabela 2. Em seguida, após lavagens apropriadas, utilizou-se o anticorpo secundário IgG de coelho biotilado na diluição de 1:1500 juntamente com 5% de soro AB e 5% de soro de cabra normal para bloqueio de ligações inespecíficas. Os cortes foram incubados durante 45 minutos a 37°C. Foram feitas lavagens com TBSS e em seguida fez-se o bloqueio da peroxidase endógena em mistura de metanol contendo peróxido de hidrogênio (30 vol) a 6%, por 30 minutos à temperatura ambiente.

Novas lavagens em tampão, (TBS) seguida do complexo ABC (Kit elite Vector Inc. Burlingame, EEUU) preparado segundo recomendações do fabricante , e incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após novas lavagens a revelação foi feita utilizando-se como substrato da peroxidase, a diaminobenzidina (DAB) (Sigma Diagnostic, Co, EEUU) 0,075% e peróxido de hidrogênio 0,01%. A reação foi interrompida por lavagens em água destilada e água corrente.

As revelações foram contra coradas em hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol, e montados com lamínulas de vidro com bálsamo do Canadá.

4.5 CONTROLES

Em todas as reações, foram utilizados controles positivos e negativos, como abaixo discriminados:

- a) Imunoglobulina de coelho não imuno - isotipo IgG na diluição de 1:3.000 substituindo o anticorpo primário.
- b) Secções de linfonodo com tuberculose, como controle positivo e negativo para as citocinas TNF- α e IFN- γ .
- c) Os controles positivo e negativo para a citocina TGF- β , foram secções de pele de pacientes com Hanseníase Virchowiana (GOULART et al., 1996).

4.6 ANTICORPOS

O anticorpo anti-TNF- α é um anticorpo neutralizante, uma IgG, obtida de coelho a partir de fator de necrose tumoral humano recombinante. Apresenta reatividade cruzada com TNF- α de rato, porém, não reage com o do camundongo. Este anticorpo foi utilizado na demonstração desta citocina, em células mesenquimais e nas camadas do trofoblasto de placentas do primeiro trimestre de gestação (HAYNES et al., 1993).

O anticorpo anti-IFN- γ , obtido em coelho a partir de IFN- γ humano recombinante é uma mistura de IgG e IgM. Embora seja um anticorpo neutralizante foi utilizado em imunohistoquímica, para a demonstração desta citocina.

4.7 INTERPRETAÇÃO

Os cortes corados em H-E foram examinados sem o conhecimento prévio quanto ao grupo a que pertenciam (HIV+ / HIV-) ao microscópio óptico para identificação das lesões quanto ao número de granulomas, presença de necrose, arquitetura dos granulomas e composição celular dos mesmos.

As lâminas coradas pelo Ziehl–Nielsen foram avaliadas ao microscópio óptico para identificação do bacilo nas referidas secções. Todos os cortes das reações imunohistoquímicas também foram avaliadas sem o conhecimento prévio do examinador do grupo ao qual pertenciam (HIV+ / HIV-), em grande aumento e em áreas equivalentes dos granulomas nos três cortes para identificação das citocinas. Os resultados foram quantificados através de uma tabela algorítmica com valores variando de zero a quatro (0-4) segundo a quantidade de células coradas e a intensidade do sinal observado nas áreas examinadas.

Para comprovar a validade deste método e evitar viés de observação, foi solicitado a opinião de outros patologistas, tanto nas lâminas coradas pelo H-E quanto nas marcações imunohistoquímicas. Os resultados foram então comparados ao do examinador inicial sendo tirado daí uma média cujos valores foram apresentados no estudo.

Como o critério de escores é subjetivo e depende do examinador, foi adotado o manual de elaboração de laudos histopatológicos da sociedade brasileira de patologia que utiliza um critério semelhante com a marcação imunohistoquímica para receptores hormonais nos casos de câncer de mama.

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

A avaliação dos casos HIV+ revelou alguns aspectos interessantes que devem ser melhor explorados morfológicamente pois não raro fogem ao padrão da resposta granulomatosa descrita na literatura (ROBBINS, 2000; DE BRITO & FRANCO, 1994).

As secções histológicas do grupo HIV+ mostram granulomas mal formados, os quais apresentam, na maioria das vezes, extensas áreas de necrose apresentando de permeio células inflamatórias caracteristicamente polimorfonucleares (Figura 1A, 1C, 1E). Dificilmente vêem-se células mononucleares com aspecto epitelióide, motivo pelo qual utilizo nestes casos a denominação de agregados celulares granulomatóides que seria o termo que melhor traduziria a morfologia destas lesões.

Observando-as do centro para a periferia, notamos que este tipo de necrose caseosa tem aspectos morfológicos distintos da necrose observada no grupo HIV- pois freqüentemente são observadas células inflamatórias necróticas ou em apoptose em meio a material amorfo e eosinofílico, o que não ocorre no grupo sem SIDA (Figura 1B, 1D, 1F). A este tipo de necrose poderíamos, para fins didáticos, denominar citolítica já que se trata de um tipo especial de necrose caseosa que apresenta um índice de citólise que chama a atenção. Morfológicamente quando olhamos as lesões no pequeno aumento do microscópio pensamos em necrose caseosa porém, quando as observamos no grande aumento ficam nítidos os detalhes acima mencionados e que se diferenciam da necrose do grupo HIV-. As lesões são extensas e difusas na maioria das vezes.

Figura 1: Fotomicrografias das lesões pulmonares coradas em H/E.

A: Caso HIV+. Lesão granulomatóide em meio a tecido pulmonar preservado. Não se vêem células epitelióides, presença de extensa necrose com arranjo morfológico nodular (40x).

B : Caso HIV- . Granulomas bem formados com três zonas distintas vendo-se necrose caseosa central, zonas intermediária e periférica bem definidas. Nota-se extensão da reação inflamatória ao tecido pulmonar adjacente (40x).

C : Caso HIV+. Detalhe da arquitetura da lesão granulomatóide. Vê-se na parte superior da figura a necrose citolítica e nas demais áreas um infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares. Não há distinção entre as zonas 2 e 3 (100x).

D Caso HIV -. Detalhe do granuloma vendo-se no centro e porção inferior esquerda a necrose caseosa com zona 2 bem definida no canto superior direito vendo-se uma célula gigante destacada (100x).

E : Caso HIV+. Detalhe da necrose . Observar a riqueza de células polimorfonucleares em meio ao material de necrose caseosa (400x).

F: Caso HIV - . Detalhe da transição entre as zonas 1 e 2 do granuloma. Observar na porção superior da figura a necrose e no restante da figura a representação da zona 2 com predominância de células mononucleares (400x).

HIV +

HIV -

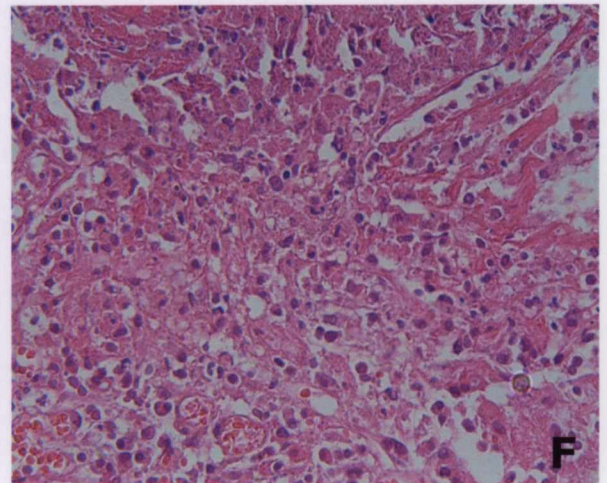
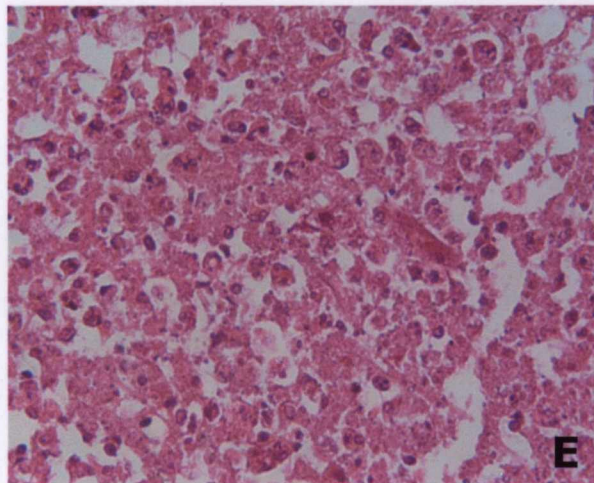
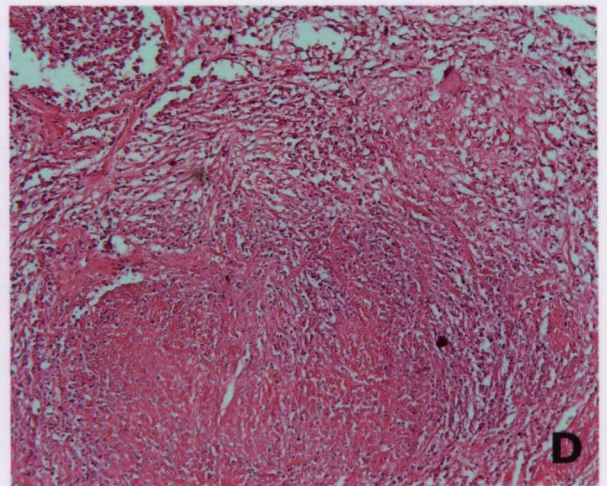
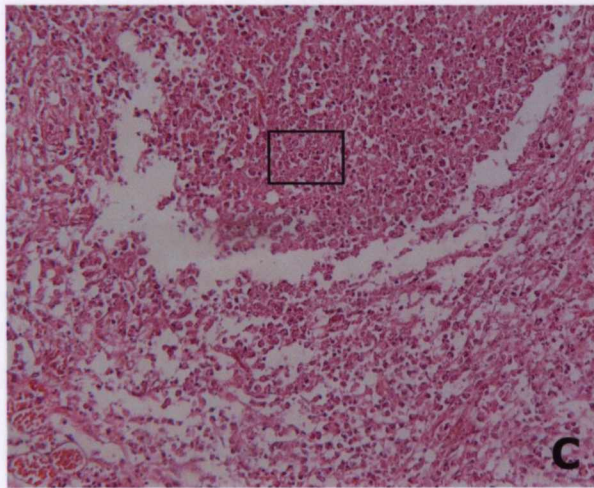
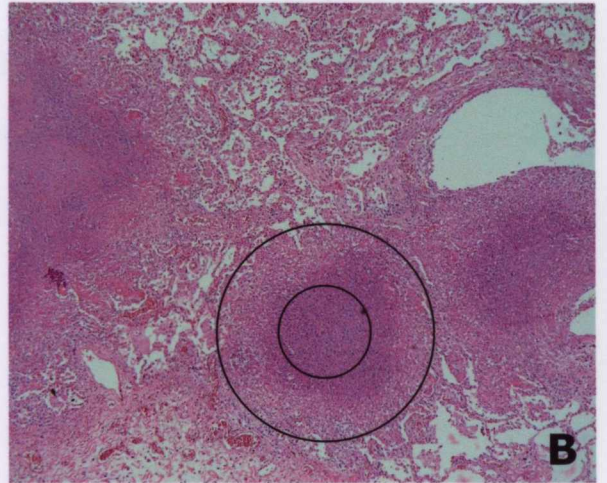
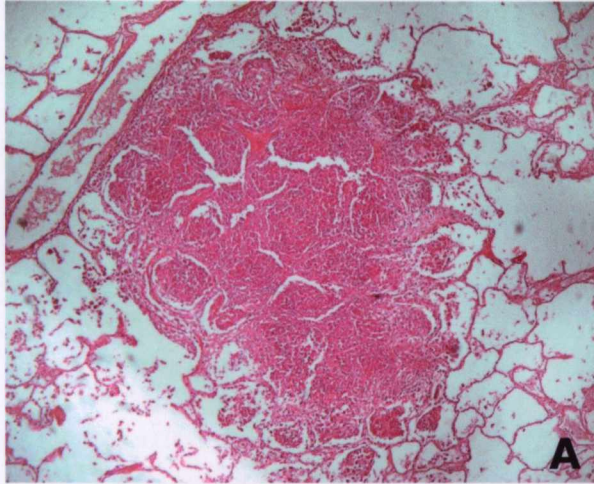


Figura 1. Fotomicrografias das lesões pulmonares coradas em H/E

Observa-se ainda que as lesões do grupo HIV+ apresentam população celular heterogênea onde vêem-se freqüentes polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos fazendo parte do infiltrado inflamatório que compõem os agregados celulares granulomatóides com poucas células de aspecto morfológico linfocitário, sem células gigantes multinucleadas ou células de aspecto epitelióide e muita necrose (Figura 1C, 1E).

Ainda explorando a morfologia destas lesões observa-se em apenas um dos casos do grupo HIV+ (A -54/95) a presença de células gigantes multinucleadas fazendo parte do granuloma.

Este caso em particular não apresenta células do tipo polimorfonucleares nos granulomas o que foge ao observado nos outros casos do grupo. Neste caso também não se observa a disposição arquitetural referida nos demais casos do grupo onde temos um padrão que se repete com a necrose citolítica ocupando grande parte da lesão e as células polimorfonucleares e mononucleares se misturam na periferia destas áreas em zonas mal definidas (Figura 1C).

Comparativamente, os pacientes estudados no grupo HIV- exibiram granulomas bem formados, apresentando arquitetura preservada com três zonas bem definidas onde se vê área central com necrose do tipo caseosa, zona intermediária com células mononucleares, epitelióides e por vezes células gigantes multinucleadas além do manto linfocitário periférico (Figura 1B, 1D).

Neste grupo não são evidenciados polimorfonucleares neutrófilos ou eosinófilos fazendo parte da população celular do granuloma.

A distinção morfológica das células do grupo HIV- não deixa dúvidas quanto a sua linhagem pois os macrófagos exibem citoplasma amplo de aspecto espumoso ou eosinofílico e os linfócitos são tipicamente pequenos, com núcleos arredondados

ou ovóides e citoplasma escasso. Em um dos casos do grupo HIV- observa-se fase cicatricial do granuloma com presença de fibrose.

No que se refere aos aspectos histológicos é possível constatar que existem dois padrões nitidamente distintos de apresentação morfológica da tuberculose melhor evidenciados quando analisamos atentamente os granulomas. Primeiro a quantidade de lesões e de necrose é maior no grupo HIV+ quando comparado ao grupo HIV-. Outro aspecto relevante é a arquitetura destas lesões que está preservada somente no grupo HIV-. No grupo HIV+ não há uma distinção nítida entre as três zonas descritas pelos autores o que dificulta a análise dos resultados. Neste grupo também observa-se maior quantidade de bacilos identificáveis pelo Ziehl-Nielsen em relação ao grupo HIV-. A composição celular dos granulomas é o aspecto que está mais alterado onde vêem-se predominantemente polimorfonucleares neutrófilos e algumas células mononucleares nas lesões do grupo HIV+, o mesmo não ocorrendo com o grupo HIV-, onde a composição celular segue o que está descrito na literatura com predomínio de células mononucleares. A tabela 4 mostra os principais achados histopatológicos descritos.

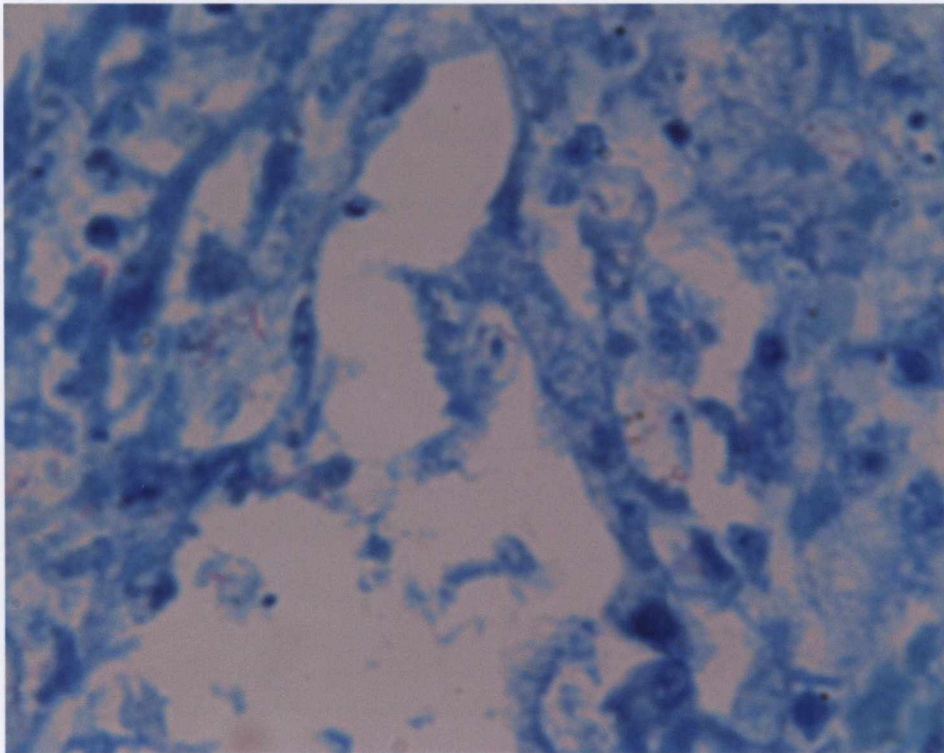
TABELA 4: Comparação Dos Principais Achados Histopatológicos

H/E	HIV+	HIV-
GRANULOMAS	-	++
AGREGADOS CELULARES GRANULOMATÓIDES	+++	-
NECROSE	++++	++
ARQUITETURA DOS GRANULOMAS	ALTERADA, 3 ZONAS POUCO NÍTIDAS	MANTIDAS, 3 ZONAS NÍTIDAS
COMPOSIÇÃO CELULAR	POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS, EOSINÓFILOS, PLASMÓCITOS E CÉLULAS MONONUCLEARES	MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS, CÉLULAS EPITELIÓIDES, CÉLULAS GIGANTES
PRESENÇA DO BACILO	+++	+

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO BACILO

A análise da presença do bacilo nas lesões foi feita através da técnica histoquímica especial que cora em vermelho pela fucsina microorganismos álcool-ácido resistentes (BAAR) conhecida como Ziehl-Nielsen. Esta técnica permite a visualização direta dos microorganismos.

Em 50% dos casos do grupo HIV+ não foi possível identificar bacilos nas lesões, porém quando a identificação foi positiva o número destes microorganismos foi sempre considerável (figura 2). No grupo HIV- não se vêem bacilos na grande maioria dos casos. Este aspecto não mostrou associação importante com os demais critérios morfológicos analisados.



800X

Figura 2. Fotomicrografia de tecido pulmonar com a coloração especial do Ziehl-Nielsen para identificação de bacilos álcool-ácido resistentes. Notar a presença dos bacilos alongados corados em vermelho no citoplasma dos macrófagos (800x).

5.3 IMUNOHISTOQUIMICA

5.3.1 Tnf- α

Observa-se positividade para esta citocina em 5 dos 6 casos HIV+ analisados exibindo um padrão de marcação misto onde vêem-se células com marcação tanto membranar como citoplasmática. A intensidade do sinal observado varia de moderado a intenso em todos os casos positivos. Fica nítida a localização das células positivas na zona periférica por vezes vendo-se células também marcadas no meio da necrose, o que pode ser citocina no interior de células em apoptose. A tabela utilizada para quantificação desta citocina teve como critérios a quantidade de células marcadas nos granulomas a intensidade do sinal das células marcadas. (Figura 3A,3C,3E). Os valores atribuídos pelos observadores estão representados na Tabela 5 após ser tirado uma média dos valores de cada um .

TABELA 5: Valores absolutos das citocinas pela imunohistoquímica no grupo HIV+.

	TNF-α	TGF-β	IFN-γ
Caso 1	0	1	0
Caso 2	2	1	2
Caso 3	3	1	2
Caso 4	3	1	1
Caso 5	1	2	1
Caso 6	1	1	0

No grupo HIV-, a positividade atingiu 100% dos casos novamente repetindo-se aqui o padrão de marcação misto e a localização das células marcadas observada no grupo anterior (Figura 3B,3D,3F). Os valores absolutos estão descritos na Tabela 6.

TABELA 6: Valores absolutos das citocinas no grupo HIV- .

	TNF-α	TGF-β	IFN-γ
Caso 1	1	1	0
Caso 2	2	1	0
Caso 3	4	1	2
Caso 4	2	0	0

Figura 3. Fotomicrografias de tecido pulmonar com reação imunohistoquímica para o TNF- α .

A : Caso HIV + : Tecido pulmonar com lesão granulomatóide representada por necrose na parte inferior esquerda , e com células marcadas na região periférica da lesão e nos septos , na parte superior direita (40x).

B : Caso HIV - . Granuloma intensamente marcado para TNF- α (40x).

C : Caso HIV +: detalhe da foto A, com poucas células marcadas na região periférica e com intensidade de sinal moderada. Em meio a necrose vê-se artefato da reação (100x).

D : Caso HIV - . Detalhe da foto B, vendo-se célula gigante multinucleada e demais células do granuloma (zona 2) com marcação em membrana predominantemente (100x).

E : Caso HIV+ . Grande aumento para identificação de ocasionais células mononucleares com marcação intracitoplasmática (400x).

F : Caso HIV - . Grande aumento para melhor visualização da positividade da reação mostrada nas fotos B e D. Observar a intensidade do sinal e o padrão de marcação intracitoplasmático e de membrana (400x).

HIV +

HIV -

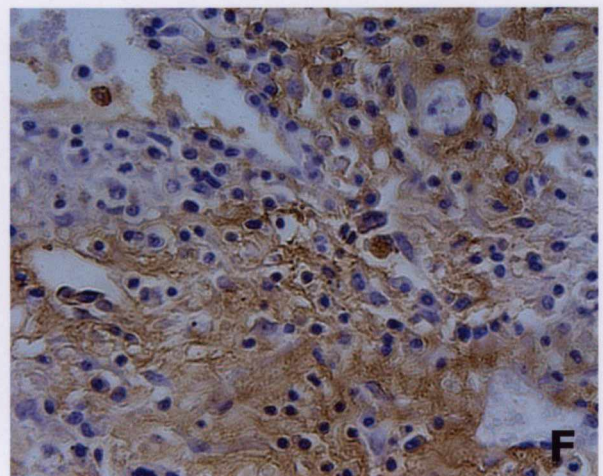
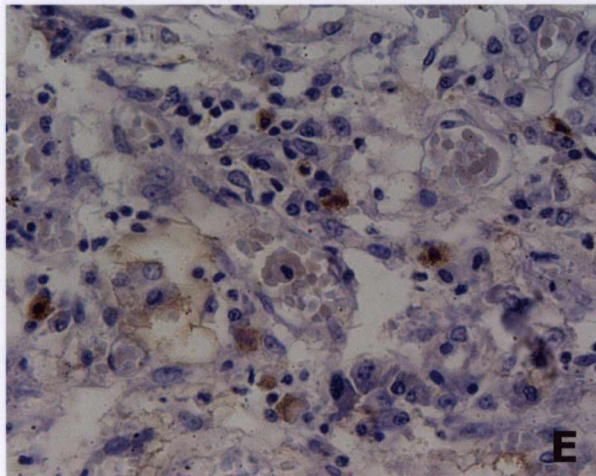
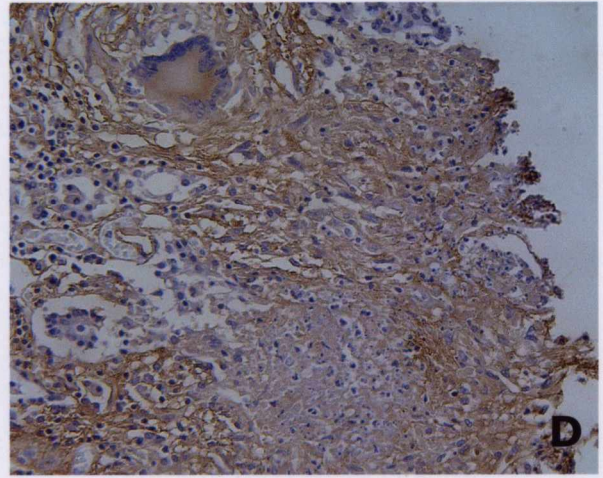
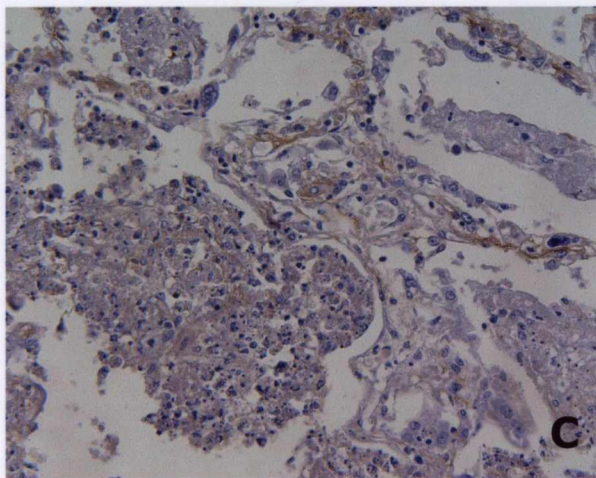
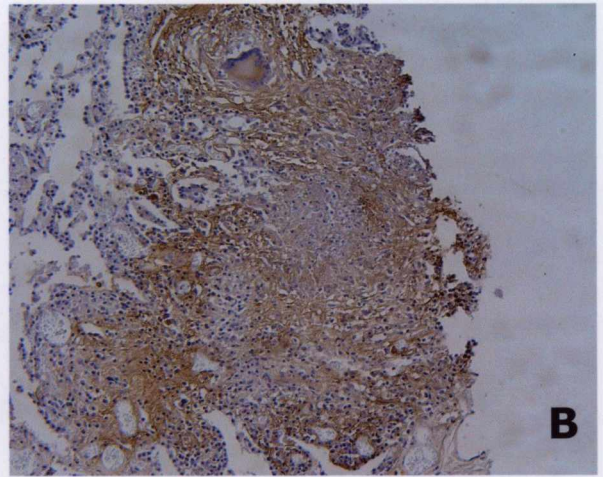
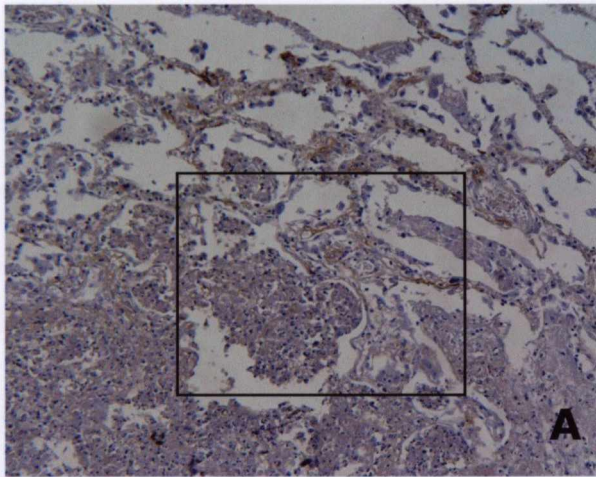


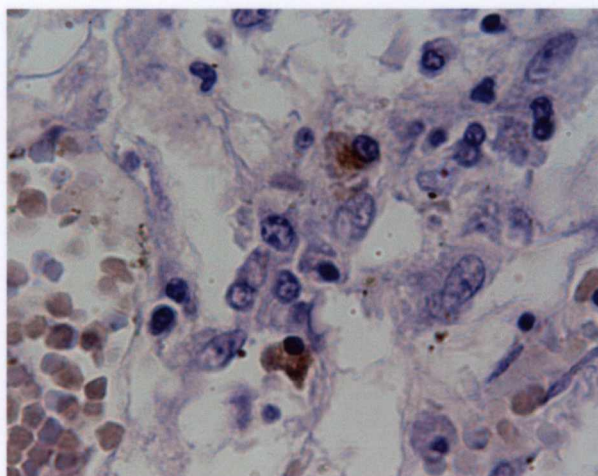
Figura 3. Fotomicrografias d de tecido pulmonar com reação imunohistoquímica para TNF- α .

5.3.2 Tgf- β

100% dos casos foram positivos para esta citocina no grupo HIV+ apresentando padrão citoplasmático de marcação e intensidade de sinal satisfatório (Figura 4). Esta citocina exibiu um padrão linear de positividade com variação insignificante entre os casos estudados conforme os valores apresentados na Tabela 5.

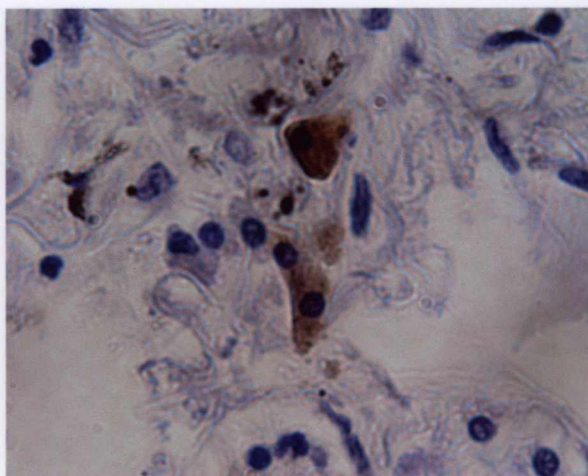
Repete-se no grupo HIV- a positividade de quase 100% para esta citocina com localização periférica nas zonas 2 e 3 , padrão citoplasmático e intensidade de sinal idêntica em todos os casos positivos. Observa-se aqui também um padrão linear invariável de marcação (Tabela 6) (Figura 4). Consequentemente, o valor desta citocina para o estudo não deve ser computado pois as variações entre os casos dos grupos e mesmo entre os grupos foi discreta.

HIV +



800X

HIV -



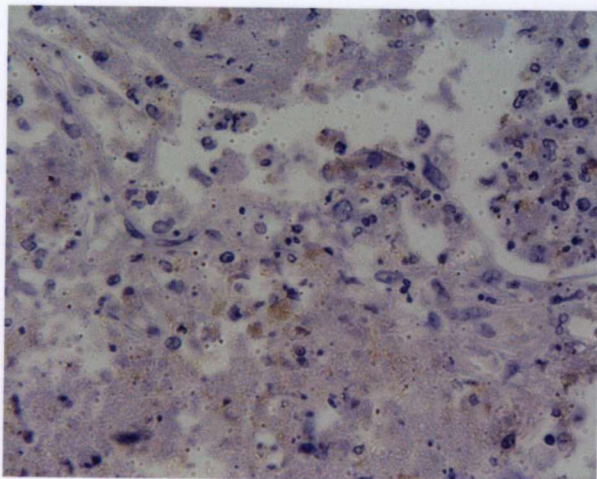
800X

Figura 4 : Fotomicrografias de tecido pulmonar com reação imunohistoquímica para o TGF- β . Ambos os grupos exibem um padrão intracitoplasmático de marcação com intensidade de sinal equivalentes bem como a quantidade de células marcadas (800x).

5.3.3 Ifn- γ

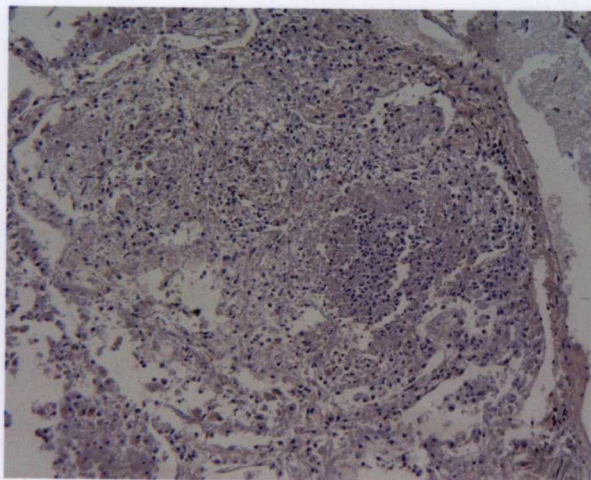
No grupo HIV+, surpreendentemente 04 foram positivos para esta citocina do total de 06 casos analisados. A positividade foi intracitoplasmática para todos os casos considerados positivos. A distribuição das células marcadas nas lesões granulomatóides foi predominantemente na zona periférica (Figura 5). A positividade para esta citocina no grupo HIV- foi de 25% (Tabela 6) com localização do sinal intracitoplasmática estando as células marcadas localizadas nas zonas 2 e 3 dos granulomas (Figura 5).

HIV +



400X

HIV -



100X

Figura 5: Fotomicrografias de tecido pulmonar com reação imunohistoquímica para o IFN- γ . Notar que não há um padrão definido de marcação nítido nos grupos sendo difícil quantificar o resultado. (HIV+ 400x ; HIV- 100x)

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

6.1.1 Necrose

O presente estudo demonstrou dois padrões morfológicos distintos de apresentação das lesões nos grupos analisados: No grupo HIV+ estas lesões são predominantemente mal delimitadas, com extensas áreas de necrose central onde vêem-se muitas células em apoptose e com arquitetura mal definida além da predominância de células polimorfonucleares na sua composição e no grupo HIV- vêem-se granulomas bem formados com arquitetura definida compostos basicamente por células mononucleares, epitelióides e por vezes gigantes multinucleadas. Estes aspectos nos mostram que existem duas apresentações morfológicas para a mesma doença em seres humanos quando a resposta imune celular está alterada.

Temos no grupo HIV+ lesões que talvez fosse melhor denominar agregados celulares granulomatóides, ou granulomas incompletos devido a falta de características morfológicas e celulares para a definição de granuloma. Nestes casos observaram-se lesões com extensas áreas de destruição tecidual com presença de necrose citolítica associada, entretanto ocupam regiões bem delimitadas e mais ou menos bem definidas. Na periferia destas lesões vê-se tecido pulmonar sem alterações inflamatórias com septos interalveolares finos, sem congestão ou edema. Estes aspectos reforçam a semelhança com a disposição arquitetural de um granuloma (MARIANO, 1995).

Em outros casos é possível notar que as lesões são menos delimitadas com extensão intra-alveolar do processo inflamatório o que nos mostra uma deficiência maior na imunidade celular destes casos.

Nos casos do grupo HIV- a necrose é sempre do tipo caseosa característica, quando presente, não se observando células em apoptose ou citólise acentuada e os granulomas bem formados.

6.1.2 Arquitetura

Já no pequeno aumento do microscópio, vê-se que a arquitetura típica do granuloma (FENHALLS et al., 2002; MARIANO,1995) difere nos grupos sendo imperfeita no grupo HIV+ no qual não se define com nitidez a zona três que estaria representada pelo manto periférico de linfócitos e não sendo também facilmente identificável a transição entre as zonas um e dois, esta última apresentando uma população celular mista (Figura 1A, 1C).

Já nos casos do grupo HIV- observam-se as três zonas descritas pelos autores facilmente e bem definidas (Figura 1B,1D). Há ainda granulomas que se encontram em fase de cicatrização os quais fogem dos padrões morfológicos analisados.

6.1.3 Composição Celular

As diferenças são nítidas neste aspecto e são as mais relevantes estando basicamente representadas pela frequência maior de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos nos agregados celulares do grupo HIV+. Neutrófilos participam ativamente do processo de fagocitose e destruição do *M. tuberculosis* precocemente porém a sua participação na ativação e modulação da resposta

imune celular natural ou adquirida ainda é controversa e não foi demonstrada em modelos experimentais (FULTON et. al., 2002).

No grupo HIV- estas células não fazem parte do granuloma onde observam-se células gigantes multinucleadas e células epitelióides na zona dois, além do manto linfocitário periférico (Figura 1B, 1D).

Em conjunto estas variações morfológicas demonstram que a imunidade celular está alterada não permitindo ao organismo com SIDA montar uma resposta satisfatória contra o *mycobacterium tuberculosis*, enquanto nos pacientes imunocompetentes este fenômeno não é observado. Pode-se também observar que a presença dos polimorfonucleares tardiamente nos agregados celulares granulomatosos pode ter um significado importante, porém ainda não demonstrado, da sua efetiva participação na modulação da resposta imune celular o que seria uma evidência da adaptação do sistema imune a um novo microambiente imunológico.

Sabe-se que pacientes HIV+ que adoecem com o *M. tuberculosis* têm a carga viral aumentada pelo aumento da replicação intracelular do vírus assim como uma diminuição do número de células T CD4+ (BRASIL, 2001; GASCON et. al., 2002). O número de linfócitos T CD4+ IFN- γ secretores aumenta após a terapia antiretroviral específica fortalecendo a resposta imune celular específica contra o bacilo (RICHARD et.al., 2002).

A carga viral plasmática apresenta redução em pacientes com tuberculose co-infectados pelo HIV e que não estão em uso de drogas antiretrovirais mas que são tratados para tuberculose isoladamente (BRASIL, 2001).

Portanto, apesar dos achados morfológicos serem semelhantes entre os pacientes do mesmo grupo, podemos atribuir as variações intrínsecas presentes nos agregados granulomatóides do grupo com SIDA a diferentes fases da Síndrome e também pelas interações entre HIV e *M. tuberculosis* com maior ou menor comprometimento da resposta imune celular.

Não estão disponíveis informações clínicas detalhadas sobre a carga viral ou a contagem periférica de células T CD4+ dos casos selecionados para o estudo o que prejudica uma correlação mais eficaz dos fatos.

Um outro fato que corrobora esta observação está evidenciado na identificação do bacilo através do método de coloração pelo Ziehl-Neelsen onde temos casos HIV+ que não apresentam bacilos quando o que se esperaria é um alto parasitismo consequente do comprometimento imunológico observado na maioria destes pacientes.

Da mesma maneira observam-se no grupo HIV- poucos granulomas sem necrose e um caso com identificação positiva do bacilo através do Ziehl. Já neste caso atribui-se que o momento da autópsia coincidiu com a fase bacilífera da doença onde se observa alto parasitismo o que é diferente de um estado de deficiência imunológica específica de células T CD4+.

Segundo UMAIMAINTHAN (UMAIMAINTHAN et.al., 2002), que demonstrou experimentalmente que a eficácia da resposta imune celular contra o *M. tuberculosis* é diferente a depender da via de entrada do bacilo no organismo o que pode explicar em parte a presença destes microorganismos em granulomas de pacientes imunocompetentes pois nestes casos o sistema imune ainda não estaria totalmente ativado mesmo que o paciente tenha sido previamente imunizado com o BCG. Então há dois mecanismos distintos para explicar o mesmo fato.

6.2 IMUNOHISTOQUIMICA

Está bem estabelecido na literatura o papel fundamental das citocinas na imunomodulação dos granulomas na tuberculose pulmonar (ELNER, 1997). Vários experimentos *in vitro* e em modelos murinos apontam as citocinas do pólo Th1 da resposta imune celular IFN- γ e TNF- α como principais responsáveis pelos eventos relacionados ao controle da proliferação do bacilo bem como da ocorrência de necrose e destruição tecidual (ZHANG et. al., 1995).

Estudos em espécimes cirúrgicos de seres humanos utilizando a hibridização *in situ* RNA-RNA bem como a imunohistoquímica demonstram que estas e outras citocinas além de confirmarem as observações experimentais descritas na literatura podem ter ações sinérgicas e ainda mostrarem valores variados nos granulomas denotando que o microambiente do granuloma é diversificado e que a sua modulação imunológica é um processo dinâmico e individual (FENHALLS et. al., 2000; 2002).

A co-infecção HIV/TB em humanos altera o perfil de citocinas presentes nas lesões onde passam a predominar o TNF- α relacionado com maior quantidade de necrose e de apoptose das células inflamatórias nos granulomas e principalmente nos agregados celulares granulomatóides, enquanto ocorre diminuição do IFN- γ juntamente com a redução da contagem das células T CD4 + (ELNER, 1997; GASCON et. al., 2002; HIRSCH et. al., 2001).

No presente estudo houveram variações dos dados obtidos da literatura consultada pois na maioria dos pacientes HIV+ não houve disparidade entre as citocinas TNF- α e IFN- γ estando ambas aumentadas nestes pacientes o que nos faz acreditar que ainda mantenham uma imunidade celular preservada com a contagem de células T CD4 + acima dos níveis críticos ou que estejam fazendo um

mecanismo compensatório alternativo desconhecido via células polimorfonucleares. No grupo HIV- observa-se, em um dos casos, perfil de citocinas semelhante ao do grupo com SIDA porém, com valores absolutos mais elevados (Tabela 6).

Estes resultados podem estar relacionados ao alto parasitismo observado neste caso em especial, característico da fase bacilífera da doença e que certamente produzirá valores elevados de citocinas. Em geral o que se observou no estudo concorda com o que está descrito na literatura, neste grupo em particular.

Os demais casos deste grupo não marcaram para o interferon-gama o que, não deve ser interpretado como alteração na imunidade celular adquirida destes casos pois, as dificuldades técnicas para marcação de substâncias intracelulares, com meia vida tão curta como o interferon-gama e em material de autópsia, que pode ficar até uma semana em formol sem ser processado, devem ser levadas em consideração.

A citocina TGF- β não teve associação com os parâmetros imunológicos aqui avaliados pois não houve variação nos valores absolutos dignos de nota em nenhum dos dois grupos (Tabelas 5;6).

6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As variações morfológicas nos dois grupos são nítidas e evidenciam padrões distintos de resposta inflamatória para uma mesma doença em decorrência de variações no estado imunológico destes pacientes. O conhecimento deste espectro de apresentações é importante tanto para estratégias de tratamento quanto para o diagnóstico precoce o que constitui um sério problema clínico atualmente.

A participação das citocinas Th1 está demonstrada *in situ* e as suas variações com o que está descrito na literatura (ELNER, 1997; HIRSCH et. al., 2001; FENHALLS et. al., 2000; ZHANG et. al., 1995) podem ser multifatoriais o que nos leva acreditar que outros componentes teciduais como a matriz conjuntiva e as suas células, quimiocinas e neutrófilos(FULTON et. al., 2002) possam estar tendo alguma influência.

6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das principais limitações deste estudo foi o número pequeno de casos para comparação principalmente no grupo HIV- .

Tal fato se deveu em parte a problemas com os blocos e relatórios de autópsia pois recentemente o serviço de anatomia patológica do HUPES passou por uma reforma completa o que acabou prejudicando o arquivo. Outro fato importante é a dificuldade técnica para realização de imunohistoquímica em material de autópsia pois a fixação em formol sendo inadequada prejudica a marcação de algumas citocinas bem como dos fenótipos das células. Há também o fato de que algumas citocinas não são disponíveis comercialmente para estudo em tecidos incluídos em parafina como é o caso da IL – 10 por exemplo.

Desta forma quando se analisam os resultados não se observa significância estatística dos valores. Outro aspecto que pode interferir nos resultados , principalmente com as citocinas , é o fato de que os pacientes HIV+ podem estar em fases diferentes de doença o que traduz estados imunológicos diferentes. A maneira mais fidedigna de se parear os pacientes seria pela carga viral plasmática e /ou pela contagem de células T CD4 + no sangue periférico. Dificilmente estes exames chegam nos prontuários para os patologistas.

7 CONCLUSÕES

- Os padrões morfológicos de resposta ao bacilo da tuberculose pulmonar são distintos quando se comparam pacientes HIV+ com HIV- .
- As lesões dos casos HIV+ demonstram elevada frequência de polimorfonucleares, extensa necrose e ausência de granulomas bem formados.
- As lesões dos casos HIV- foram caracterizados por granulomas bem formados e intensa presença de TNF- α .
- O comprometimento da resposta imunocelular demonstrado pelo TNF-a nos casos HIV+ provavelmente induz alterações do padrão morfológico das lesões tuberculosas.

8 REFERÊNCIAS

- BARRAL-NETTO, M., A. Barral , C. Brodskyn , E. M. Carvalho and S. G. Reed Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **17**:21-28, 1995.
- BLUMENTHAL, A., S. Ehlers , M. Ernst , H-D Flad and N. Reiling, Control of mycobacterial replication in human macrophages: roles of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. **Infect. Immun.**, **70**:4961-4967, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Atualização das recomendações para tratamento da co-infecção HIV/tuberculose em adultos e adolescentes. **Bol. Epidemiol. AIDS**, **15**:39-45, 2001.
- CLEMENS, D.L.; LEE, B.Y.; HORWITZ, M.A. The Mycobacterium tuberculosis phagosome in human macrophages is isolated from the host cell cytoplasm. **Infect. Immun.**, **70**:5800-5807, 2002.
- DE BRITO, T.; FRANCO, M.F., Viewpoint-Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **36**:185-192, 1994.
- D'SOUZA, S., V. Rosseels, O .Denis, A Tanghe, N. De Smet, F. Jurion, K. Palfliet, N. Castiglioni, A Vanokelen, C. Wheeler and K. Huygen , Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. **Infect. Immun.**, **70**:3681-3688, 2002.
- ELLNER, J.J. Review: the immune response in human tuberculosis--implications for tuberculosis control. **J. Infect. Dis.**, **176**:1351-1359, 1997.
- FENHALLS, G. L. Stevens, J. Bezuidenhout, G. E. Amphlett, K. Duncan, P. Bardin and P. T. Lukey , Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Immunology**, **105**:325-335, 2002.
- FENHALLS, G., L. Stevens, L. Moses, J. Bezuidenhout, J. C. Betts, P. V. Helden, P. T. Lukey and K. Duncan, In situ detection of Mycobacterium tuberculosis transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. **Infect. Immun.**, **70**:6330-6338, 2002.
- FENHALLS, G., A Wong, J. Bezuidenhout, P. V. Helden, P. Bardin and P. T. Lukey , In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Infect. Immun.**, **68**:2827-2836, 2000.
- FULTON, S.A., S. M. Reba, T. D. Martin and W. H. Boom, Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during Mycobacterium bovis BCG infection in C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, **70**: 5322-5327, 2002.

GASCON, R.L., A B. Naváez, R. Zhang, J. O Khan, F. M. Hecht, B. G. Herndier and M. S. McGrath, Increased HLA-DR expression on peripheral blood monocytes in subsets of subjects with primary HIV infection is associated with elevated CD4 T-cell apoptosis and CD4 T-cell depletion. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **30**:146-153, 2002.

HASHIMOTO, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A Masuda, M. Matsuoka and M. Makino, Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. **Infect. Immun.**, **70**: . 5167-5176, 2002.

HENGEL, R.L., M. C. Allende, R. L. Dewar, J. A Metcalf, J. M. Mican and H. C. Lane, Increasing CD4+ T cells specific for tuberculosis correlate with improved clinical immunity after highly active antiretroviral therapy. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **18**:969-975, 2002.

HERZOG, H. History of tuberculosis. **Respiration**, **65**:5-15, 1998.

HIRSCH, C.S., Z. Toossi, J. L. Johnson, H. Luzze, L. Ntambi, P. Peters, M. McHugh, A Okwera, M. Joloba, P. Mugenyi, R. D. Mugerwa, P. Terebuh, and J. J. Elner Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active Mycobacterium tuberculosis infection in human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, **183**:779-788, 2001.

JACOBS M. ,M. W. Marino, N. Brown, B. Abel, L-G Bekker, V. J. F. Quesniaux, L. Fick, and B. Ryffel Correction of defective host response to mycobacterium bovis BCG infection in TNF- deficient mice by bone marrow transplantation. **Lab. invest.** **80** 901-915: 2000.

JIAO, X., R. Lo-Man, P. Guernonprez, L. Fiette, E. Dériaud, S. Burgaud, B. Gicquel, N. Winter, and C. Leclerc Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. **J. Immunol.**, **168**:1294-1301, 2002.

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

MARIANO, M. Invited Review – The experimental Granuloma. A hypotesis to Explain the persistence of the lesion. **Rev . Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**:161-176, 1995.

MCSHANE, H., S. Behboudi, N. Goonetilleke, R. Brookes, and A V. S. Hill , Protective immunity against Mycobacterium tuberculosis induced by dendritic cells pulsed with both CD8(+)- and CD4(+)-T-cell epitopes from antigen 85A. **Infect. Immun.**, **70**:1623-1626, 2002.

ORRELL, J.M., S. J. Brett, J. Ivanyi, G. Coghill, A Grant and J. Swanson Beck , 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.

PALENDIRA, U., A G. D. Bean, C. G. Feng, and W. J. Britton , Lymphocyte recruitment and protective efficacy against pulmonary mycobacterial infection are independent of the route of prior *Mycobacterium bovis* BCG immunization. **Infect. Immun.**, **70**:1410-1416, 2002.

PASULA, R.; WISNIOWSKI, P.; MARTIN, W.J. Fibronectin facilitates *Mycobacterium tuberculosis* attachment to murine alveolar macrophages. **Infect. Immun.**, **70**:1287-1292, 2002.

REPIQUE, C.J., A Li, M. Collins, and S. L. Morris , DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. **Infect. Immun.**, **70**:3318-3323, 2002.

RUFFINO-NETTO, A. Programa de controle da tuberculose no Brasil: Situação atual e novas perspectivas. **Inf. Epidemiol. SUS**, **10**:129-138, 2001.

SERBINA, N.V.; LAZAREVIC, V.; FLYNN, J.L. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, **167**:6991-7000, 2001.

SIRIARAYAPON, P., H. Yanai, J. R. Glynn, S. Yanpaisarn, and w. Uthaivoravit , The evolving epidemiology of HIV infection and tuberculosis in northern Thailand. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **31**:80-9, 2002.

STERLING, T.R., S. E. Dorman, R. E. Chaisson, L. Ding, J. Hackman, K. Moore, and S. M. Holland , Human immunodeficiency virus-seronegative adults with extrapulmonary tuberculosis have abnormal innate immune responses. **Clin. Infect. Dis.**, **33**:976-982, 2001.

VANKAYALAPATI, R. B. Wizel, S. E. Weis, B. Samten, W. M. Girard, and P. F. Barnes , Production of interleukin-18 in human tuberculosis. **J. Inf. Dis.**, **182**:234-239, 2000.

YAMADA H. , **S. Mizumo, R. Horai, Y. Iwakura, and I. Sugawara** , Protective role of interleukine-1 in mycobacterial infection in IL-1 α/β double knock-out mice. **Lab. invest.** **80** 759-767:2000.

ZHANG, M., Y. Lin, D. V. Iyer, J. Gong, J. S. Abrams, and P. F. Barnes , T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, **63**:3231-3234, 1995.