

ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA

***Estudo da Micobacteriose Pulmonar em pacientes
autopsiados com e sem AIDS. Avaliação
histopatológica, imunohistoquímica e caracterização
das espécies de micobactérias por PCR***

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia. Área de Patologia.

PIRACICABA

2006

ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA

***Estudo da Micobacteriose Pulmonar em pacientes
autopsiados com e sem AIDS. Avaliação
histopatológica, imunohistoquímica e caracterização
das espécies de micobactérias por PCR***

Dissertação apresentada a Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em
Estomatopatologia. Área de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustín
Vargas

Co-orientador: Prof. Dr. Oslei Paes de
Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edgard Graner

Profa. Dra. Thais Maud

Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida

Piracicaba

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38e	<p>Silva, Andréia Aparecida da. Estudo da Micobacteriose Pulmonar em pacientes autopsiados com e sem AIDS. Avaliação histopatológica, imunohistoquímica e caracterização das espécies de micobactérias por PCR. / Andréia Aparecida da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadores: Pablo Agustín Vargas, Oslei Paes de Almeida. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Tuberculose pulmonar. 2. Micobactérias. 3. AIDS (Doença). 4. Diagnóstico. I. Vargas, Pablo Agustín. II. Almeida, Oslei Paes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: Study of the pulmonary mycobacteriosis in patients autopsied with and without AIDS. Histopathology, immunohistochemical evaluation and characterization of the species of mycobacteria for PCR

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Tuberculosis, pulmonary. 2. Mycobacteria. 3. AIDS (Disease). 4. Diagnosis

Área de concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora: Edgard Graner, Thais Maud, Oslei Paes de Almeida

Data da defesa: 23/02/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2006, considerou a candidata ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA aprovada.

Handwritten signature of Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

PROF. DR. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Handwritten signature of Prof. Dra. Thaís Mauad.

PROFa. DRa. THAÍS MAUAD

Handwritten signature of Prof. Dr. Edgard Graner.

PROF. DR. EDGARD GRANER

2006A1 222

DEDICATÓRIAS

A DEUS, por iluminar o meu caminho e permitir mais essa dádiva em minha vida, e me mostrar que mais importante do que ter fé é confiar.

*Momentos felizes louve a DEUS
Momentos difíceis busque a DEUS
Momentos silenciosos adore a DEUS
Momentos dolorosos, confie em DEUS
Cada momento agradeça a DEUS*

Aos meus pais José Antonio e Angelina, e aos meus queridos irmãos Leandra e André.

*Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse
Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz
Vocês perderam noites de sono para que eu dormisse
Acreditaram em mim, apesar de meus erros
Jamais esqueçam que levarei para sempre um pedaço de vocês dentro do meu ser!
Obrigada por todos os incentivos em minhas decisões.*

A minha avó Cecília Moreli da Silva, exemplo de perseverança, bondade e fé.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

É bom dar quando solicitado, melhor, porém, é dar sem ser solicitado por haver apenas compreendido. Há pessoas que quando deveriam ser apenas professores foram mestres. Que deveriam ser mestres, foram amigos. Você Pablo é uma delas. Minha eterna gratidão por toda confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida

*Ser mestre não é apenas lecionar
Ensinar não é apenas transmitir a
matéria
Ser mestre é ser instrutor, amigo, guia e
companheiro
Ser mestre é ser exemplo.
Exemplo de dedicação, de doação, de
dignidade pessoal
E sobre tudo amor.
Minha eterna gratidão*

À Dra. Thais Mauad, pelo exemplo de competência, seriedade e dinamismo.
Obrigada pela oportunidade, pela troca de idéias e pela atenção.

*“Sábio não é quem dá as verdadeiras
respostas mas, quem formula as
verdadeiras questões”
Thomas Davis*

À Mariza Akemi Matsumoto por todo incentivo desde a graduação, por todos os momentos de alegrias e de superação dos momentos difíceis. Muito obrigada por tudo que fez e faz por mim... Que a nossa amizade seja eterna!

*Cada pessoa que passa em nossa vida é
única, sempre deixa um pouco de si e
leva um pouco de nós.*

Às minhas queridas amigas Lílian, Monique, Cláudia, Tânia e Néia vocês moram no meu coração! Obrigada pelos conselhos, incentivos e pela amizade de vocês!

*Às vezes na vida,
você encontra um amigo especial;
que transforma sua vida simplesmente.
Alguém que faz você rir...
Alguém que faz você acreditar em
coisas boas...
Alguém que convence você
de que existe uma porta destrancada
só esperando para que você abra.
Esta é a Amizade Para Sempre.
Quando você está deprimido
E o mundo parece escuro e vazio,
seu amigo para sempre anima seu
espírito
fazendo com que aquele mundo escuro
e vazio
de repente pareça iluminado e
preenchido.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador do Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos, contribuindo para a realização do mestrado.

Ao professor Jacks Jorge Júnior pela boa vontade e atenção com que sempre nos recebe e nos atende.

Ao professor Márcio Ajudarte Lopes exemplo de pesquisador e de profissional. Obrigada pelo incentivo, paciência, dedicação e ensinamentos profissionais e científicos.

Aos professores da área de Biologia Molecular Edgard Graner e Ricardo Della Colleta. É uma satisfação, um prazer trabalhar e conviver com vocês que muito tem a nos ensinar a cada dia.

Ao professor Oswaldo de Hipólito Júnior sempre tão carinhoso com todos.

Ao Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva chefe do departamento de Patologia da FMUSP, pelo apoio nessa pesquisa e exemplo de profissional!

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMUSP: Vera, Liduvina, Zilá, Carlos, Júnior por todo carinho, atenção e boa disposição que sempre me receberam. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração

As técnicas de Laboratório do Departamento de Patologia da FMUSP: Cássia Arruda, Keila Maria da Silva, Maria Cristina Rodrigues Medeiros, Maria das Neves de Souza, Rosely Ferreira de Siqueira, Kely Cristina Soares Bispo, Ady Pereira de Araújo Santos, Ana Paula Marie da Silva, Celina Helena Araújo, Weluma Hereze Alves de Souza por toda paciência e compreensão da importância de cada uma delas, na realização das pesquisas.

Ao Nilton do SVOC, pelo carinho e atenção, muito obrigada!

Aos funcionários do laboratório de Patologia da FOP, Adriano Luís Martins, Rosa Maria Fornasiari, João Carlos G. da Silva em especial a querida Ana Cristina do Amaral Godoy por todo carinho e paciência que sempre tiveram comigo!

A Selma Domingos do Nascimento e Lucinda Conceição Boareto Malageta!

“(...) aprendi que se depende sempre, de tanta muita diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas de lições diárias de outras tantas pessoas. É tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente, onde quer que a gente vá. É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho, por mais que a pessoa pense estar (...)”

Gonzaguinha. Caminhos do coração

Aos meus queridos amigos Luci, Carol, Dudu, Jorge e Chico! Obrigada por todos os bons momentos de nossa convivência!!

Aos meus amigos de pós-graduação: Danyel, Fábio Ito, Fábio Ornellas, Ademar, Michele Agostini, Sabrina, Mônica, Lilia, Patrícia, Guillermo, Lays, Michele, Rebeca, Kênia, Érica, Dawton, Marcelo e Marco Antonio.

À Ana Lúcia Carrinho Ayrosa Rangel por toda atenção e sempre boa vontade!
Muito obrigada !

Pode ser que um dia deixemos de nos falar.

Mas, enquanto houver amizade, faremos as pazes de novo.

Pode ser que um dia o tempo passe.

Mas, se a amizade permanecer, um do outro há de se lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos.

Mas, se formos amigos de verdade, a amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos.

Mas, se ainda sobrar amizade, nasceremos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe.

Mas, com a amizade construiremos tudo novamente, cada vez de forma diferente, sendo único e inesquecível cada momento que juntos viveremos e nos lembraremos pra sempre.

*Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existe
milagre;*

*A outra é acreditar que todas as coisas
São um milagre.*

Albert Einstein 1879 - 1955

Aos professores da disciplina de cirurgia e traumatologia buco maxilo facial da Universidade do Sagrado Coração: Hugo Nary Filho, Roberto Kawakami, Mariza Akemi Matsumoto, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Luís Eduardo Padovan, Aparício F. Dekon e Eduardo Gonçalves de Oliveira. Por todas as oportunidades....minha eterna gratidão.

À Ana Paula Boconcelo Vargas e Sílvia Piacentini Paes de Almeida

Ao meu querido amigo Wanderson, que mesmo a distância sempre torceu por mim!

Aos meus amigos João Rodolfo e Murilo que tanto me ajudaram na finalização desse trabalho... meu sincero agradecimento!!

À todos que participaram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“A gentileza não custa nada e mesmo
assim, compra coisas de valor
incalculável”*

Muito obrigada.

EPÍGRAFE

*Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs,
o sabor das massas e das maçãs,
é preciso amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha, e ir tocando em frente
como um velho boiadeiro levando a boiada,
eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
estrada eu sou*

*Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
de ser feliz*

*Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz, de ser feliz.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	04
1. INTRODUÇÃO	05
2. REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1. DADOS DEMOGRÁFICOS DA AIDS	07
2.2. HIV	08
2.3. PATOGENIA DA AIDS	09
2.4. TUBERCULOSE	11
2.5. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	13
2.6. PERFIL IMUNOLÓGICO DA TUBERCULOSE	14
2.7. GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	16
2.8. COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i>	18
2.9. AIDS E TUBERCULOSE	19
2.10. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE	22
2.10.1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAIS	22
2.10.2. MÉTODOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	23
2.10.3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES	25
3. PROPOSIÇÃO	30
4. MATERIAL E MÉTODO	31
4.1. PACIENTES	31
4.2. DADOS OBTIDOS DOS PRONTUÁRIOS HOSPITALARES	31
4.3. COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS	31
4.4. REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICA	31
4.5. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	32
4.6. MÉTODOS MOLECULARES	33
4.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA	33
4.6.2. CONTROLES POSITIVOS	35
4.6.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	36
5. RESULTADOS	39
5.1. DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	39
5.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	48
5.3. REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICA	52
5.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	59
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

BAAR – Bacilo álcool ácido resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guerin

HAART – Terapia antiretroviral altamente ativa

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ - Interferon gamma

IL – Interleucina

IS – Seqüência de inserção

LTR – Long terminal repeats sequences

MB – Micobacteriose

MBP – Micobacteriose Pulmonar

MAC – Complexo *Micobacterium avium*

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SIV – Vírus da imunodeficiência símia

TB – Tuberculose

ZN – Ziehl-Neelsen

RESUMO

Introdução: A Micobacteriose (MB) é uma das principais causas de mortes no mundo e sua incidência aumentou significativamente com o surgimento da AIDS. **Objetivos:** Os objetivos do presente trabalho foram comparar o padrão da resposta inflamatória nas MBs pulmonares (MBP) entre dois grupos (Grupo I: MBP; Grupo II: MBP/AIDS), e caracterizar as espécies de micobactérias através da técnica de PCR. **Material e Métodos:** Foram selecionados 16 casos de MBP para o grupo I e 59 casos para o grupo II, provenientes de pacientes autopsiados no Departamento de Patologia da FMUSP entre 1975 a 2004. Realizamos colorações de H&E e Ziehl-Neelsen (ZN) para o estudo histopatológico, e para o estudo imunohistoquímico utilizamos anticorpos Anti-BCG, CD4, CD8, CD15, CD20 e CD68. Selecionamos 20 casos de MBP distribuídos igualmente entre os dois grupos para a identificação das espécies *M. tuberculosis* e *M. avium*. **Resultados:** A média de idade do grupo I foi de 28,52 anos \pm 18, 21 anos e do grupo II foi de 36,2 anos \pm 10,36 anos. Histopatologicamente observamos o padrão de granulomas bem formados em 15 casos do grupo I, enquanto que no grupo II houve um predomínio de granulomas mal formados. A coloração de ZN foi positiva em 82,35% e 84,75% dos casos para o grupo I e grupo II, respectivamente. A imunohistoquímica para BCG foi positiva em todos os casos de ambos os grupos. O grupo I apresentou uma maior prevalência de linfócitos TCD4 (37,65%), seguido pelos linfócitos TCD8 (26,85%), macrófagos (23,71%), linfócitos B (7,31%) e neutrófilos (4,4%). Já no grupo II observamos um predomínio de macrófagos (50,28%), seguido por linfócitos TCD8 (23,75%), TCD4 (20,05%), linfócitos B (4,47%) e neutrófilos (1,45%). A espécie de *M. tuberculosis* foi identificada em 8 casos de ambos os grupos. A espécie *M. avium* foi identificada apenas em 01 caso do grupo II. **Conclusão:** Com o advento da AIDS houve uma mudança no perfil imunológico da MBP devido à depleção dos linfócitos TCD4. O anticorpo anti-BCG pode ser útil para identificar casos de MB

que foram negativos para ZN. A Micobacteriose pulmonar foi causada principalmente por *M. tuberculosis* em ambos os grupos.

ABSTRACT

Introduction: Micobacteriosis (MB) is one of the main causes of deaths around the world and its incidence has been increased significantly with the emergence of the AIDS. **Objectives:** Our aims were to compare the pattern of the inflammatory response in the pulmonary MBs (PMB) between two groups (Group I: PMB; Group II: PMB/AIDS), and to identify the mycobacterium species using PCR technique. **Material and Methods:** 16 cases of PMB for group I and 59 cases for group II had been selected from autopsied patients in the Department of Pathology of the FMUSP between 1975 to 2004. We performed H&E and Ziehl-Neelsen (ZN) for the histopathology study, and for the immunohistochemical study we use Anti-BCG antibodies, CD4, CD8, CD15, CD20 and CD68. We select 20 cases of PMB distributed equally in the both groups for the identification of the *M. tuberculosis* and *M. avium*. **Results:** The mean age was 28,52 years \pm 18, 21 and 36,2 years \pm 10,36 for the group I and group II, respectively. The histopathology analysis showed well-organized granulomas in 15 cases of the group I, while the group II exhibited a predominance of the poorly organized granulomas. The ZN was positive in 82,35% of the cases in the group I and 84.75% in the group II. The immunohistochemistry for BCG was positive in all cases of the both groups. Group I presented a strong prevalence of TCD4 lymphocytes (37,65%), followed by TCD8 lymphocytes (26,85%), macrophages (23,71%), B lymphocytes (7,31%) and neutrophils (4,4%). The group II displayed a predominance of macrophages (50,28%), followed by TCD8 lymphocytes (23,75%), TCD4 lymphocytes (20,05%), B lymphocytes (4,47%) and neutrophils (1,45%). The species of *M. tuberculosis* was identified in 8 cases of both the groups. The species of *M. avium* was only found in one case of the group II. **Conclusion:** With the advent of the AIDS it had a change in the immunologic profile of the MBP because of the depletion of lymphocytes TCD4. The antibody anti-BCG can be useful to identify cases of PMB that had been negatives for ZN. The PMB was mainly caused by *M. tuberculosis* in both groups.

INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença retroviral, caracterizada por acentuada deficiência do sistema imunológico, devido a uma grande perda de células T CD4+ e de um comprometimento da função das células T auxiliares sobreviventes, resultando em um aumento da ocorrência de múltiplas infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (Cotran *et al.* 2004). É causada pelo HIV, um retrovírus humano, pertencente à família dos lentivírus (Harries & Maher, 1996). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) até dezembro de 2005, cerca de 40,3 milhões de pessoas já foram infectadas pelo HIV no mundo (UNAIDS, 2005). No Brasil estima-se que 372 mil pessoas estejam infectadas pelo vírus (Ministério da Saúde, 2005).

A TB é uma doença causada por micobactérias, as quais possuem alto conteúdo lipídico em sua parede celular. A TB humana é causada principalmente por espécies de crescimento lento como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium kansasii* (Kin *et al.* 2001), sendo transmitida através de perdigotos ou pelo espirro ou tosse de indivíduos com TB em locais fechados, escuros e sem ventilação. Os pacientes infectados pelo HIV possuem um maior risco de desenvolver TB ativa por causa do alto risco de reativação latente da infecção (Cruciani *et al.* 2001). Além disso, a TB desenvolve-se rapidamente nesses indivíduos (Mayaud & Cadranel 1999), sendo causada principalmente pela espécie de *Mycobacterium tuberculosis* (Davallois *et al.* 1997). Nos pacientes HIV+ a TB pulmonar é a forma mais comum da doença (Boletim epidemiológico HIV/AIDS 2003).

A literatura mostra que na década de 70 a TB era causada principalmente pelo “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” e acometia pacientes com pneumopatias prévias, como enfisema pulmonar e bronquite crônica. Em 1981 com o surgimento da AIDS, o “complexo *Mycobacterium avium*” e *M. tuberculosis* tornaram-se as espécies mais associadas ao quadro de TB (Afessa

et al. 1998; French *et al.* 1997; Opravil 1997). Quando os níveis de linfócitos TCD 4 estão muito baixos e com a evolução das lesões, os bacilos podem penetrar nos vasos sanguíneos, através dos quais são levados a outros pontos do parênquima pulmonar e a outros órgãos, desenvolvendo TB extrapulmonar (miliar). Os locais mais comuns de acometimento da TB miliar são: baço, fígado, medula óssea, rins, trato gastro intestinal, meninges e glândula parótida (Rangel *et al.* 2005, Golden MP & Vikram HR 2005, Vargas *et al.* 2003, Smith *et al.* 2000). Até o momento não existem trabalhos na literatura demonstrando o perfil imunológico de micobacterioses pulmonares provenientes de material embocado em parafina antes e após o surgimento da AIDS.

O diagnóstico inicial da doença micobacteriana é baseado em evidências clínicas e o diagnóstico definitivo envolve o isolamento e a identificação laboratorial do bacilo. Nos últimos 10 anos algumas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para a detecção das micobactérias, reduzindo o tempo de diagnóstico de algumas semanas a alguns dias (Soini & Musser 2001). A técnica de PCR tem sido utilizada para a amplificação de ácidos nucleicos de micobactérias (Hsiao *et al.* 2003), permitindo amplificar especificamente pequenos fragmentos de DNA, os quais são específicos de alguns tipos de micobactérias.

Neste trabalho analisamos as características histológicas, imunohistoquímicas e caracterizamos as espécies de micobactérias por PCR presentes nas micobacterioses pulmonares embocadas em parafina provenientes de autópsias realizadas em pacientes com e sem AIDS no período de 1975 a 2004 no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dados Demográficos da AIDS

Desde a primeira evidência clínica da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida em 1981, 40,3 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo vírus e cerca de 20 milhões já morreram de AIDS no mundo. As taxas de infecção estão ainda em ascensão em muitos países da África Sub-Saária, sendo a principal causa de morte nesse continente. Um dado marcante do último Boletim Epidemiológico da UNAIDS (2005) é o crescente número de mulheres entre 15 e 49 anos infectadas pelo HIV, representando quase 57% dos adultos que vivem com HIV na África Sub-Saária e 77% de todas as mulheres com HIV no mundo (UNAIDS 2005).

A AIDS é hoje a quarta causa de morte no mundo e de acordo com o boletim epidemiológico da UNAIDS (2005), de um total de 40,3 milhões de pessoas infectada, 38 milhões correspondem a adultos e 2,3 milhões a crianças menores de 15 anos. Em 2005 ocorreram 4,9 milhões de novas infecções e destas 700,000 corresponderam a crianças até 15 anos. Foram registradas aproximadamente 3,1 milhões de mortes em 2005. Cerca de 1/3 das pessoas que vivem com HIV/AIDS encontram-se na faixa etária entre 15 e 24 anos.

No Brasil, a epidemia de AIDS teve início nos primeiros anos da década de 80. O número de casos registrados até junho de 2005 é de 372 mil casos (Ministério da Saúde, 2005). De acordo com dados do Ministério da Saúde (2005), a epidemia da AIDS no Brasil encontra-se em patamares elevados, tendo atingido, em 2005, 19,2 casos por 100 mil habitantes. Observa-se uma tendência à estabilização da epidemia entre homens, entretanto, observa-se um crescimento da epidemia entre as mulheres, com aumento da taxa de incidência em 2005 (14,1 casos por 100 mil mulheres).

Quanto as principais categorias de transmissão entre os homens, as relações sexuais correspondem por 58% dos casos de AIDS, com maior prevalência nas relações heterossexuais (25%). Entre as mulheres, a transmissão do HIV ocorre, predominantemente, pela via sexual, correspondendo a 86% dos casos. As demais formas de transmissão, em ambos os sexos, de menor impacto na epidemia são: transfusão sanguínea, transmissão materno-infantil, usuários de drogas ilícitas, ou ignoradas pelo paciente (Boletim Epidemiológico AIDS e DST, 2004).

2.2. HIV

A AIDS é causada pelo HIV, um retrovírus humano, pertencente à família dos lentivírus que precisam da enzima transcriptase reversa para se multiplicar. Existem duas formas de HIV geneticamente diferentes, HIV-1 e HIV-2, sendo que o HIV-1 é o tipo mais comum associado a AIDS nos EUA, Europa e África central, enquanto que o HIV-2 é mais comum principalmente na África ocidental. Entretanto parecem ter a mesma origem filogenética, originando-se do SIV (vírus da imunodeficiência símia). A via de transmissão parece ser a mesma, entretanto, o HIV-2 tem um menor risco de transmissão e pode levar a uma progressão mais lenta para a AIDS (Harris & Maher, 1996). O HIV é um vírus esférico com núcleo eletrodense rodeado por um capsídeo protéico, que é envolvido por um envelope lipídico derivado da célula infectada. O núcleo contém quatro proteínas, incluindo a p24 e p17, duas fitas de RNA e uma enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em DNA, permitindo assim que o vírus possa integrar-se ao genoma da célula hospedeira. No envelope lipídico há duas glicoproteínas, gp120 e gp41, que são fundamentais para a infecção das células pelo vírus. O genoma proviral do HIV contém aproximadamente 10.000 pares de bases com 2 LTR (long terminal repeats sequences) e 9 regiões, sendo 3 delas codificadoras dos genes maiores *gag*, *pol* e *env* que codificam os componentes estruturais e funcionais. Os produtos dos genes *gag* e *pol* são traduzidos inicialmente em proteínas precursoras grandes

que devem ser clivadas pela protease viral para fornecer as proteínas maduras. Além desses três genes retrovirais comuns, o HIV contém outros genes, como *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* que regulam a síntese e montagem das partículas virais infecciosas. O gene *tat* produz a regulação na rápida replicação viral. O gene *rev* também é essencial à replicação do HIV, exercendo seus efeitos a um nível pós-transcrição por regulação do transporte do RNAm viral do núcleo para o citoplasma. Os produtos dos genes *vpu* e *vif* atuam no fim do ciclo biológico viral e parecem ser essenciais ao brotamento de vírions das células infectadas (*vpu*) e da capacidade de infectar outras células (*vif*). O gene *vpr* ajuda a aumentar a produção de vírus por diversos mecanismos, permitindo que as células incapazes de se dividir como, por exemplo, os macrófagos sejam infectados pelo HIV. Além disso, o *vpr* detém o ciclo celular na fase G2 durante a LTR (Long Terminal repeats sequences) viral é mais ativa, maximizando a proteção viral. Por fim, a proteína *nef* parece ser essencial ao desenvolvimento da infecção progressiva (Cotram *et al.* 2004, Klatt 2004).

2.3. Patogenia da AIDS

A infecção pelo HIV é caracterizada por uma imunossupressão profunda, que afeta primariamente a imunidade celular, devido a uma perda acentuada de células T CD4+ e de um comprometimento da função das células T auxiliares sobreviventes. Existem evidências científicas de que a molécula CD4 é um receptor de alta afinidade para o HIV. Isso ocorre porque a glicoproteína gp 120 presente na membrana do HIV tem afinidade pelas moléculas CD4+ dos linfócitos. Essa proteína liga-se a outras moléculas da superfície celular, ou seja, a co-receptores, para que o vírus consiga entrar na célula. Duas moléculas de superfície celular, a CCR 5 (receptores das β -quimiocinas) e CXCR 4 (receptores de α -quimiocinas) exercem esse papel, formando um novo local de reconhecimento em gp 120 para esses co-receptores. Outra proteína denominada de gp 41 auxilia no processo de fusão do vírus com a membrana celular das células T ou macrófagos alvo. Após a fusão, o cerne viral contendo o

genoma do HIV entra no citoplasma celular (Cayabyab *et al.* 2004). Uma vez dentro da célula, o genoma viral sofre transcrição reversa, levando a formação de cDNA (DNA pró-viral). Em células T quiescentes, o cDNA pode permanecer em uma forma epissômica linear. Nas células T em divisão, o cDNA adquire uma forma circular, entra no núcleo e integra-se ao genoma do hospedeiro. Embora a redução acentuada de células TCD4+ possa ser responsável pela maior parte da imunodeficiência nos estágios avançados da infecção pelo HIV, há evidências de que se podem detectar defeitos qualitativos nas células T até mesmo em indivíduos assintomáticos (Cotran *et al.* 2004). Tem sido demonstrada uma aparente disfunção nas células T helper de pacientes HIV+ assintomáticos independentes do número de células CD4 e do estágio clínico (Clerici & Shearer 1993; Clerici *et al.* 1989). Alterações na produção e regulação de citocinas por linfócitos Th (helper) CD4 tem importantes efeitos nos eventos imunológicos associados à doença (Maggi *et al.* 1994; Graziosi *et al.* 1994). As células Th são definidas pelas citocinas que sintetizam. Sendo assim as células Th1 produzem Interferon (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) e Fator de necrose tumoral (TNF- β); as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Maggi *et al.* 1994; Graziosi *et al.* 1994; Yssel *et al.* 1992; Mosmann *et al.* 1986); as células Th0 secretam todas as citocinas citadas anteriormente (Veronesi *et al.* 2000; Del Prete *et al.* 1993; Rocken *et al.* 1992; Yssel *et al.* 1992). Porém, não há uma associação precisa entre a distribuição dos grupos de células Th e a progressão da doença. Clerenci & Shearer (1993) sugerem que a resistência, em contraste com a progressão para a AIDS é dependente do predomínio de resposta Th1 sobre Th2, e ao invés disso favorece a expressão do fenótipo Th0. Além disso, estudos “*in vitro*” mostram que clones Th2, e principalmente Th0, suportam a replicação viral enquanto isso não é observado em clones Th1 testados (Maggi *et al.* 1994). Sendo assim, as diferentes citocinas produzidas pelos grupos de células Th e as secretadas por outros tipos de células regulam a resposta imune do hospedeiro à infecção do HIV.

Por outro lado, tem sido demonstrado que uma aparente disfunção nas células Th de pacientes HIV+ assintomáticos pode ocorrer independentemente do número de células CD4 e do estágio clínico (Clerenci & Shearer 1993; Clerenci *et al.* 1989). Portanto, os defeitos qualitativos que podem ser observados nas células T incluem: redução na proliferação de células T induzidas por antígenos, diminuição das respostas Th1 em relação ao tipo Th2 e defeitos da sinalização intracelular. O desequilíbrio entre respostas Th1 e Th2 favorece as respostas humorais sobre a imunidade celular.

Em decorrência das inúmeras alterações que ocorrem no sistema imunológico, os pacientes apresentam linfopenia, redução da função das células T com perda de células de memória, suscetibilidade a infecções oportunistas, neoplasias, diminuição da hipersensibilidade do tipo tardio; alterações das células B e alterações nas funções de macrófagos e monócitos com redução da quimiotaxia, fagocitose e capacidade de apresentação de antígeno.

Desta forma o sistema imunológico vai sendo lenta e progressivamente deteriorado gerando o desenvolvimento de uma série de doenças oportunistas, que pode culminar na morte do paciente (Cotran *et al.* 2004).

2.4. Tuberculose (TB)

A TB é uma doença bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* e ocasionalmente por outras espécies como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*. A transmissão ocorre pelo ar através de perdigotos, espirro ou tosse de indivíduos com TB pulmonar. A transmissão geralmente ocorre em locais fechados, escuros e sem ventilação. O risco do indivíduo se infectar depende do tempo de exposição e da susceptibilidade do mesmo. Uma vez infectado, o indivíduo permanece nesse estado por muitos anos e a maioria (90%) das pessoas HIV negativas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* não desenvolvem a doença, entretanto, pessoas infectadas pelo HIV podem desenvolver TB a qualquer momento.

Vários fatores podem acarretar o desenvolvimento da doença, como por exemplo, o estresse físico e emocional, subnutrição, e principalmente co-infecções associadas ao HIV.

A infecção primária (TB primária) ocorre na exposição ao bacilo. O bacilo escapa das defesas muco-ciliares dos brônquios, alojando-se nos alvéolos pulmonares terminais. A infecção inicia-se pela multiplicação dos bacilos, correspondendo ao foco de Gohn. A drenagem linfática leva os bacilos aos linfonodos hilares. O conjunto foco de Gohn e linfadenopatia hilar corresponde ao foco primário. Pode ocorrer ainda, uma disseminação sangüínea para o corpo com acometimento para outros órgãos, o que é denominado TB miliar. A resposta imune (hipersensibilidade tardia e imunidade celular) se desenvolve cerca de 4 a 6 semanas após a infecção primária e o curso da doença dependerá do estado imunológico do indivíduo. Como consequência da infecção primária, a infecção pode ou não evoluir, em função de uma reativação ou re-infecção, para complicações pulmonares, pleurais e para doenças disseminadas correspondendo à TB extrapulmonar que afeta principalmente linfonodos, usualmente cervicais, SNC, pericardio, estômago e intestino (Golden MP & Vikram 2005; Harries & Maher, 1996).

A TB pode acometer diferentes sítios do organismo humano, porém o pulmão é o órgão mais frequentemente envolvido. Antes da pandemia do HIV, 80 a 85% dos novos casos notificados de TB referiam a doença pulmonar isolada, 4 a 5% dos casos ao comprometimento pulmonar associado com a doença extrapulmonar e apenas 15% dos casos à doença extrapulmonar isolada (Mello 2001). Embora nos pacientes infectados pelo HIV o acometimento dos sítios extrapulmonares seja mais freqüente, a forma pulmonar continua sendo responsável por 60 a 70% dos casos notificados de co-infecção TB/HIV nos Estados Unidos da América (Mello, 2001). De acordo com uma pesquisa de Crump & Reller (2003) a TB disseminada apresenta algumas condições predisponentes como: a infecção pelo HIV, terapia imunossupressora, alcoolismo, diabetes mellitus e desordens hematológicas.

2.5. Epidemiologia da Tuberculose

Desde o início do século XX, a TB figura entre os maiores problemas de saúde em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a prevalência é alta e a doença hoje é endêmica (Saltin, Ivanti 1995).

No início da década de 80 ocorreu uma diminuição progressiva da incidência de TB e muitos microbiologistas tiveram a convicção de que a vitória contra a TB estava próxima. Na realidade, sucedeu o oposto. Atualmente as taxas de morbidade e mortalidade aumentaram, em função de espécies de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas, acompanhando o surto da epidemia da AIDS (Miziara 2005), uma vez que esses pacientes apresentam uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TB (Koneman *et al.* 2001). Estima-se que atualmente 2 bilhões de pessoas, ou seja 1/3 da população mundial esteja contaminado com o *Mycobacterium tuberculosis* ou outras espécies de *Mycobacterium*. Acredita-se que 3 milhões de pessoas morram anualmente por complicações da doença em todo o mundo e cerca de 8 milhões de novos casos são registrados a cada ano, sendo 95% em países em desenvolvimento. Existe uma estimativa que aproximadamente 15 milhões de pessoas com TB no mundo também possuam AIDS (Toossi *et al.* 2001). Aproximadamente 15 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América tenham resultado positivo à prova cutânea ou apresentam doença clínica. As taxas são ainda maiores nos países em desenvolvimento, devido principalmente, ao aumento de imigração de pessoas provenientes de regiões endêmicas, ao declínio das condições socioeconômicas nas cidades densamente povoadas e ao crescente número de indivíduos infectados com o HIV (Koneman *et al.* 2001).

Entre 23 países com alta incidência de TB, o Brasil ocupa o 14º lugar. Fontes do Ministério da Saúde estimam uma prevalência no país de 58/100.000 casos/habitantes, com cerca de 50 milhões de infectados, com 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente (Klautau GB & Kuschnaroff KT 2005; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia 2004).

2.6. Perfil imunológico da Tuberculose

O padrão morfológico da TB caracteriza-se pela resposta inflamatória crônica granulomatosa. Cabe aos macrófagos o papel de células apresentadoras de antígenos, decodificando os componentes antigênicos do bacilo e apresentando-os ao sistema imunológico celular (Melo & Afiune, 1996). Adams (1976) definiu os granulomas como coleções compactadas ou organizadas de macrófagos, derivados do sistema fagocítico mononuclear, com diferentes graus de diferenciação e maturação.

A característica da infecção causada pelo *M. tuberculosis* é que a maioria dos adultos imunocompetentes, de 90 a 95%, controla a infecção através da imunidade adquirida (Boom *et al.* 2003).

Apenas um pequeno número de bacilos que penetram nos alvéolos distais dos pulmões é suficiente para instalar a infecção. Em muitas pessoas, a imunidade inata local, mediada primeiramente por macrófagos alveolares, falha ao controlar os bacilos de replicação lenta. Estudos com macrófagos alveolares mostram importante capacidade dessas células em ampliar a defesa do hospedeiro contra as micobactérias através da liberação de citocinas. Em contato com o *M. tuberculosis* ou seus produtos como a lipoarabinomannan de sua parede celular, o macrófago libera $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, que atraem linfócitos para o local da lesão (Rom & Zhang 1993). O sistema imune é exposto a grande quantidade de antígenos bacterianos resultando no desenvolvimento de uma imunidade adaptativa. Em muitos adultos saudáveis, a resposta adaptativa é mediada por células T que controla, porém não erradica a infecção. A imunidade adaptativa protege contra a re-infecção e é particularmente importante em áreas com alta incidência de TB. A interação de células T em macrófagos infectados é central na imunidade adaptativa ou protetora e vários tipos celulares estão envolvidos na imunidade adaptativa como os macrófagos, células T CD4, e outros subtipos de células T, como células T CD8, células T gamadelta, e células T CD1. Entretanto, o papel central da imunidade contra o *M. tuberculosis* é mediada por macrófagos e

células T CD4, e o papel desses outros subtipos celulares precisa ser elucidado. Os macrófagos são essenciais no processamento e apresentação de antígenos às células T. $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ estão envolvidos também na ativação do próprio macrófago e na formação de granulomas, exercendo papel autócrino no início do processo infeccioso (Schluger & Rom 1998). Sabe-se que uma diversa população de células T reconhece uma gama de antígenos micobacterianos apresentados por diferentes moléculas apresentadoras de antígeno, o que contribui para a detecção do patógeno pelo hospedeiro. Os linfócitos T CD4 são os principais efetores da resposta imunológica mediada por células contra as micobactérias e a principal ação desses linfócitos é ampliar a resposta imune do hospedeiro através da liberação de citocinas, ativando macrófagos e recrutando células para o local da infecção (Schluger & Rom 1998). Ainda, uma pequena fração de linfócitos T CD8 podem também secretar citocinas (Dannenberg 1993).

Os linfócitos T CD4 tem receptores α/β que reconhecem antígenos processados no fagossomo de células apresentadoras de antígenos, através de molécula de MHC classe II, presentes na superfície dessas células. Os linfócitos T CD8 também apresentam os receptores α/β , porém, eles reconhecem antígenos processados no citoplasma das células apresentadoras de antígenos, através de moléculas MHC I, que está presente em quase todas as células do corpo humano (Schluger & Rom 1998).

Para sobreviver nos macrófagos, o *M. tuberculosis* desenvolve mecanismos para bloquear a resposta imune. Esses mecanismos incluem a modulação de fagossomos, neutralização de moléculas efectoras de macrófagos, indução de citocinas inibitórias e interferência no processamento de antígenos às células T. Porém a importância desses mecanismos depende do estágio de infecção: infecção primária, persistência, reativação ou TB ativa. Por exemplo, a supressão de citocinas e apoptose parecem ser mais importantes durante as fases em que o bacilo encontra-se em alta taxa de replicação, especialmente durante a fase primária e de reativação. Por outro lado a inibição do processamento de antígeno parece ser o mecanismo de defesa mais importante durante a fase

persistente da infecção. A interação hospedeiro-patógeno é determinada pela interação das células T com os macrófagos infectados. O resultado dessa interação resulta no controle da infecção ou em doença ativa (Boon *et al.* 2003).

2.7. Gênero *Mycobacterium*

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae*, sendo, portanto, o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium avium*, espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Murray *et al.* 1999; Brasil, Ministério da Saúde 1994; Holt *et al.* 1994). O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos aeróbicos, imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo 1-10µm de comprimento por 0,2-0,6µm de largura. Possuem alto conteúdo lipídico em sua parede celular tornando-a hidrofóbica e resistente a muitos desinfetantes e corantes utilizados em laboratório, apresentando assim, propriedade morfotintorial álcool-ácido resistente. Sendo assim, mantém o corante após a lavagem com álcool e ácido apresentando-se com coloração avermelhada. O tamanho do seu genoma é em torno de 4,4 mb, com alto conteúdo de G-C (62-70%). O gênero *Mycobacterium* é formado pelo “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” e mais de 80 espécies de micobactérias não-tuberculosa, sendo algumas destas são patogênicas para homens e animais, algumas oportunistas, outras não oportunistas e além de algumas saprófitas (Soini & Musser 2001). As infecções humanas são causadas principalmente por espécies de crescimento lento como *Mycobacterium tuberculosis*, pelo “complexo *Mycobacterium avium*” (MAC) e *Mycobacterium kansasii* (Kin *et al.* 2001). Entretanto, a espécie mais importante do gênero é o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo o agente causador da TB. O “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” é composto pelo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti*.

Algumas espécies são ditas não-tuberculosas, pois não são considerados verdadeiros patógenos e raramente causam infecção, exceto em casos de severa imunodeficiência, com contagem de TCD4 baixa, como na AIDS.

Esses microrganismos apresentavam anteriormente a denominação de “micobactérias atípicas”, entretanto, agora são reconhecidas como “micobactérias não-tuberculosas”. Entre essas espécies algumas são mais freqüentemente isoladas de pacientes com AIDS como: as pertencentes ao “complexo *M. avium*”, *M. kansasii*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. genaense*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae* e *M. xenopi*.

O “complexo *Mycobacterium avium*” é composto por no mínimo duas espécies: o *M. avium* e o *M. intracellulare* e são os principais agentes causadores de infecção entre as espécies não-tuberculosas. Há relatos de uma terceira espécie: o *Mycobacterium scrofulaceum*, denominado “complexo MAIS” (Inderlied *et al.* 1993). Com base nas propriedades fenotípicas e genotípicas foram propostas 3 subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e o *M. avium* subsp. *silvaticum*, entretanto, a subespécie *avium* é a única patogênica para o homem (Thorel *et al.* 1990). Estas são micobactérias de crescimento lento, não-cromogênicas que necessitam de mais de 7 dias de incubação para adquirir crescimento maduro a uma temperatura entre 35 e 37°C (Runyon 1965). Suas colônias apresentam-se pequenas, lisas e ligeiramente opacas.

A doença pulmonar em indivíduos imunodeprimidos é causada, tanto pelo *M. avium*, quanto pelo *M. intracellulare* em iguais proporções, entretanto, em pacientes HIV+, quase sempre a espécie envolvida é o *M. avium*, numa porcentagem entre 87 e 98% dos isolados (Devallois & Rastogi 1997; Inderlied *et al.* 1993).

As infecções causadas pelas diversas espécies podem levar as manifestações clínicas diferentes, as quais interferem na antibioticoterapia a ser empregada (French *et al.* 1997). A maior diferença entre TB e outras infecções micobacterianas é que o *M. tuberculosis* é transmitido de pessoa para pessoa, em função disto, é importante que a TB seja diagnosticada o mais rápido possível a fim de evitar sua propagação.

2.8. “Complexo *Mycobacterium avium*”

O MAC é um microrganismo encontrado no meio ambiente, água, solo, alimentos e animais (Leão *et al.* 1999; French *et al.* 1997). Embora o MAC seja um importante agente causador de doenças em suínos e aves domésticas, o microrganismo excretado pelas fezes desses animais persiste no solo por longos períodos, entretanto alguns estudos sorológicos e epidemiológicos não suportam a hipótese de que animais sejam um reservatório para as infecções humanas. Não há evidência suficiente da transmissão inter-humana dos microrganismos do MAC (Havlir & Ellner 2000; Murray *et al.* 1998; Peters *et al.* 1995). A identificação de microrganismos nos aerossóis de águas da costa do Atlântico similares aos isolados de pacientes com doença pulmonar sugere que a inalação desses aerossóis seja a origem da infecção (Field *et al.* 2004; Parker *et al.* 1983). Assim é possível que a infecção seja adquirida pela inalação ou ingestão de alimentos ou água contaminada, explicando o fato do isolamento inicial em escarros e fezes, e posterior desenvolvimento de doença disseminada. As manifestações clínicas da doença disseminada não são observadas até que haja replicação e invasão maciça de bacilos nos órgãos, interferindo em suas funções. O fator de risco mais importante para o desenvolvimento da doença em pacientes não infectados pelo HIV é a existência de pneumopatias crônicas como, por exemplo, a bronquite crônica ou doenças pulmonares obstrutivas (Murray *et al.* 1998). A ingestão de microrganismos do ambiente seguido pela invasão do trato gastrointestinal tem sido sugerido como a principal via de infecção nos pacientes com AIDS, uma vez que os microrganismos são frequentemente isolados das fezes desses pacientes (Damsker & Botone 1985). Há também uma correlação positiva importante entre a presença de MAC em amostras respiratórias e intestinais assintomática, mas que raramente desenvolvem doença disseminada (Jacobson *et al.* 1991). Indivíduos imunocompetentes podem ter colonização respiratória e intestinal respiratória assintomática, mas raramente desenvolvem doença disseminada (Inderlied *et al.* 1993). Nenhuma característica foi identificada para explicar porque, entre mais de

100 espécies de micobactérias “não tuberculosas”, o *M. avium* é a causa mais comum de infecção nos seres humanos (Oliveira *et al.* 2000). Segundo Lewin-Smith *et al.* (1998) a doença disseminada pelo MAC apresenta uma prevalência de 22% em pacientes HIV+, sendo que 80% dos casos apresentam uma contagem de CD4+ de 10 células/ μ l.

Algumas intervenções são necessárias para a redução das doenças micobacterianas, como a melhoria das condições sócio-econômicas, tratamento adequado e rápido, quimioprofilaxia e vacinação por BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). A medicação inadequada tem propiciado as baixas taxas de cura e o aumento da resistência às drogas empregadas. Em contrapartida, o tratamento rápido prolonga significativamente a sobrevivência dos pacientes (Opravil 1997; Porter 1996).

2.9. AIDS e Tuberculose

Sabe-se que as infecções micobacterianas estão relacionadas com uma baixa contagem de células T CD4. Está bem estabelecido que as infecções oportunistas em pacientes HIV+ estão diretamente relacionadas a um agravamento da imunossupressão e também são bons indicadores da progressão da doença (Matee *et al.* 2000, Ohtomo *et al.* 2000).

Nos últimos anos tem sido notado um aumento significativo nos casos de TB. O surgimento da AIDS na década de 80, juntamente com o surgimento de cepas resistentes à terapêutica habitual, contribuíram não somente para o aumento da incidência, como também para as mudanças na apresentação e evolução da TB (Snider & Roper 1992). Os pacientes infectados pelo HIV possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de TB ativa por causa do alto risco de reativação de infecções latentes, que evolui rapidamente nesses indivíduos (Cruciani *et al.* 2001; Mayaud & Cadranel 1999). Um paciente HIV positivo tem um risco 10 vezes maior de desenvolver TB (Harries & Maher, 1996). O risco de reativação de uma infecção micobacteriana latente é maior em pacientes HIV positivos (9,7-10,4 casos em 100 pacientes) quando comparado

aos pacientes HIV negativos (0,07-0,1 casos em 100 pacientes) (Rose *et al.* 1998).

Na recente epidemiologia dos países africanos e Sub-Saários, o número de casos de TB triplicou num período de 10 anos. A associação TB/AIDS também tem sido observada em todo o mundo. Estima-se que 21 milhões de pessoas em todo o mundo estejam co-infectados, sendo que 70% estão concentrados na África (HIV/AIDS Tuberculosis and Malaria, 2005). A epidemiologia de AIDS no Brasil mostra alta associação com a TB.

Nos pacientes infectados pelo HIV+, a TB pulmonar é a forma mais comum da doença, embora a TB extrapulmonar também seja freqüente e possa ocorrer em função da acentuada imunossupressão. As formas mais comuns de TB extrapulmonar em indivíduos HIV+ é a efusão pleural, doença pericárdica e TB miliar (Haries & Mayer 1996). Indivíduos soropositivos apresentam um padrão atípico de TB com achados radiográficos incomuns e em muitos casos o diagnóstico é feito na necropsia (Smith *et al.* 2000). Além disso, a TB aumenta a suscetibilidade para outras doenças oportunistas, assim como aumenta as taxas de mortalidade. A taxa de comorbidade TB/AIDS é considerada alta em todo mundo, especialmente no Brasil. Song *et al.* (2003) descreveram as características clínicas e epidemiológicas de 559 casos da comorbidade no período de 1989 a 1997 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os autores encontraram que a transmissão heterossexual foi a principal forma de contágio (38,9%) do HIV, seguido pelo uso de drogas injetáveis (29,3%), contato homossexual e bissexual (23,2%), transfusão sangüínea (5%) e transmissão vertical (3,6%). Houve uma predileção pelo sexo masculino. A relação homem/mulher foi de 3:1, entretanto nos últimos anos houve diminuição dessa relação. A faixa etária mais envolvida foi a de 20 a 39 anos e a maioria dos indivíduos apresentava baixa escolaridade.

A pandemia da AIDS tem propiciado o desenvolvimento de TB causada por outras espécies ditas não-tuberculosas. Antes da pandemia, micobactérias não tuberculosas raramente causavam doença, mesmo em indivíduos

imunocomprometidos. A profunda e prolongada supressão do sistema imune celular, observada na AIDS, favorece que microrganismos relativamente avirulentos possam causar a doença. Portanto, desde que a AIDS surgiu, novas doenças causadas por micobactérias com manifestações clínicas diferentes têm sido descritas. Desde então, novas espécies têm sido descobertas e os esforços têm se concentrado nas áreas de diagnóstico, tratamento e prevenção destas infecções (French *et al.* 1997).

Antes da epidemia da AIDS, o MAC era considerado como responsável, na maioria dos casos, por infecções pulmonares que acometiam pacientes com pneumopatias prévias, como enfisema pulmonar e bronquite crônica. Em 1981, com o surgimento da AIDS, o MAC apresentou-se como um dos mais freqüentes microrganismos causadores de doença nesses pacientes, sendo reconhecido como causa de infecção disseminada, afetando de 15 a 40% dos pacientes com a doença. A incidência dessas infecções tem aumentado e esse fato deve-se ao tempo prolongado de sobrevivência dos pacientes, e pelo uso indiscriminado de profilaxia para *Pneumocystis carinii* e da terapia antiretroviral.

A infecção causada pelo MAC nos pacientes imunocomprometidos, diferentemente dos imunocompetentes onde a infecção se restringe aos pulmões caracteriza-se por bacteremia e posterior disseminação para fígado, medula óssea, linfonodos e baço (French *et al.* 1997).

Na Europa central é mais freqüente a infecção por micobactérias do MAC entre os indivíduos HIV+ do que pelo *M. tuberculosis* (Opravil 1997). Em outro estudo semelhante, outros autores discordam, argumentando que a incidência do MAC em países desenvolvidos está mais relacionada com as condições gerais de moradia. Nesse estudo, os autores associaram a doença disseminada pelo MAC a diversos fatores considerados de risco, como o uso de drogas injetáveis, condição sócio-econômica e quantidade de linfócitos T CD4 periféricos. Um quarto dos pacientes analisados apresentou doença disseminada (Franzetti *et al.* 1997).

A maior parte dos dados relativos à epidemiologia da infecção disseminada pelo MAC antecede a era da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), quando as infecções provocadas por microrganismos oportunistas eram mais freqüentes. Segundo Chaisson *et al.* (1992), após a introdução da profilaxia para pneumocistose e maior sobrevivência proporcionada pela introdução da Zidovudina (AZT), a incidência da infecção pelo MAC, em um grupo de 1006 pacientes com AIDS, foi de 19%. Diferentes taxas de incidência tem sido relatadas em vários estudos envolvendo esses indivíduos. O evento mais relacionado ao desenvolvimento de infecção pelo MAC foi a baixa quantidade de células T CD4 no sangue periférico (Chaisson *et al.* 1998). Entretanto de acordo com Mayaud & Cadrenal (1999), mesmo com eficiente terapia antiretroviral (HAART) contra o HIV, a TB continua sendo um grave problema nos pacientes HIV+.

Outras infecções oportunistas podem acometer os pulmões de pacientes HIV+. Em uma revisão de 233 autópsias de pacientes HIV+, as complicações pulmonares estavam presentes em todos os pacientes e os principais achados foram broncopneumonia bacteriana (n=98), pneumonia por *Pneumocystis carinii* (n= 56) infecções micobacterianas (n= 54), infecções por Citomegalovirus (n=40), pelo *Criptococos* (n=23), Candidose (n=6), Aspergilose (n=2), Histoplasmose (n=2) e infecção pelo adenovirus em 1 caso (Afessa *et al.* 1998).

2.10. Método diagnóstico de tuberculose

2.10.1. Métodos diagnósticos convencionais

Embora o diagnóstico inicial da TB seja baseado em evidências clínicas, o diagnóstico definitivo envolve o isolamento e a identificação laboratorial do bacilo. Os pacientes que apresentam sinais suspeitos de TB como, tosse com mais de três meses de duração, produção de escarro e perda de peso, são primeiramente pesquisados quanto à positividade para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) em 3 amostras de escarros, através da coloração de Ziehl-

Neelsen (ZN). Este é um teste rápido e barato, porém possui baixa sensibilidade, pois para a detecção do bacilo, são necessários 10,000 microrganismos por mililitro de escarro. Entretanto, mesmo após repetições da pesquisa para BAAR, esses pacientes podem continuar apresentando resultados negativos, mas com evidencia clínica da doença. O procedimento laboratorial usual consiste na descontaminação, digestão do espécime, pesquisa microscópica de BAAR pela coloração de ZN, isolamento do microrganismo em cultura, identificação e teste de sensibilidade às drogas do agente infeccioso. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura micobacteriana, entretanto, a velocidade de crescimento de algumas espécies de micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis* é extremamente lenta e requer incubação de 3 a 8 semanas em meio sólido, levando portanto, algumas semanas para obtenção dos resultados, obrigando a equipe médica a instituir uma terapêutica anti-TB antes da identificação precisa da micobactéria, gerando falhas no diagnóstico e no tratamento da TB (Harries & Maher 1996; Shinnick & Good 1995). A cultura apesar de sensível (detecta de 10 a 100 microrganismos por amostra) requer microrganismos viáveis podendo falhar em pacientes que já estejam sob tratamento anti-TB. De acordo com Nagesh *et al.* 2001, não mais que 85 % dos casos de TB confirmados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, são positivos para a cultura. Além disso, pode haver contaminação laboratorial, gerando resultados falso-positivos. Por isso é necessária a realização de outros exames, testes ou técnicas, mais sensíveis e rápidos que contribuam para o diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes, uma vez que a detecção da causa e o tratamento eficaz são a chave do sucesso no controle de doenças micobacterianas (Nagesh *et al.* 2001).

2.10.2. Métodos imunohistoquímicos

A reação imunohistoquímica pode ser usada quando as colorações específicas (ZN) para demonstração dos BAAR nos tecidos falham, em virtude do pequeno número de bacilos presentes nas lesões ou quando os pacientes foram submetidos à terapêutica específica prévia que danifica as paredes bacterianas e

impede sua coloração pela fucsina, embora também não discrimine a espécie dentro do gênero *Mycobacterium*.

A imunohistoquímica é a aplicação do princípio da ligação antígeno-anticorpo para a pesquisa e localização de antígenos em cortes histológicos, através de microscopia óptica, eletrônica ou de fluorescência. A detecção por métodos imuno-enzimáticos tem substituído o método de imunofluorescência, pela facilidade de utilização de microscopia óptica, possibilitando a utilização de material embocado em parafina e principalmente pelos detalhes histológicos capazes de serem avaliados conjuntamente. O método mais utilizado é o da Avidina-Biotina-Peroxidase, desenvolvida por Hsu *et al.* 1981. A técnica explora a capacidade da avidina, uma glicoproteína moderadamente grande, de formar ligações não imunológicas com quatro moléculas de baixo peso molecular. Num primeiro momento o anticorpo primário específico liga-se ao antígeno que se quer localizar. A seguir o anticorpo secundário, conjugado a biotina, liga-se ao anticorpo primário. Através dos sítios livres de ligação da avidina, o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase liga-se ao anticorpo secundário biotilado. A cor da imunomarcação visualizada depende do cromógeno utilizado. Usa-se frequentemente a diaminobenzidina que produz a cor castanho-dourada.

A maior sensibilidade desse método, em relação às colorações específicas para detecção de BAAR nos tecidos, tem sido relatada em diversos trabalhos e é atribuída principalmente à possibilidade de detecção de bacilos não íntegros, através da visualização de material antigênico particulado por meio às células epitelióides, à necrose ou no citoplasma dos macrófagos (Carabias *et al.* 1997; Radhakrishnan *et al.* 1991; Humphrey & Weiner 1987).

Radhakrishnan *et al.* (1991) e Hove *et al.* (1998) estudaram lesões granulomatosas no SNC e em órgãos variados com suspeitas de TB, cuja coloração específica foi negativa na identificação de BAAR. Ambos mostraram positividade na imunohistoquímica para antígenos de micobactérias em 100% e 14,3%. Os autores avaliaram que o aumento da sensibilidade do método imunohistoquímico deveu-se à capacidade de detecção de antígenos de bacilos

fragmentados em meio à necrose e de material antigênico dentro do citoplasma de macrófagos e de células gigantes

2.10.3. Métodos Diagnósticos Moleculares

Na última década (1990-2000) vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção direta, identificação e teste de susceptibilidade a drogas micobacterianas. Esses métodos podem reduzir potencialmente o tempo diagnóstico de semanas a dias, embora haja necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal técnico altamente qualificado (Mello 2001).

Há vários métodos de amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos de micobactérias, os quais estão disponíveis desde 1997 e estão divididos em 3 categorias principais: 1) sistemas de amplificação da seqüência alvo, 2) sistemas de amplificação por sondas ou primers (seqüências sintéticas de oligonucleotídeos sense e antisense) e 3) sistema de amplificação de sinais. Na primeira categoria podem ser citadas as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), TMA (“Transcription-mediated Amplification”), SDA (“Strand displacement amplification”), NASBA (“Nucleic acid sequence-based amplification”). Na segunda categoria, o LCR (Reação em Cadeia da Ligase) e o Q-Beta (“Q-Beta replicase amplification”). Na terceira, o bDNA (“branched DNA signal amplification”).

O objetivo comum de todas essas técnicas é reduzir o tempo necessário para a detecção do patógeno em espécimes clínicos, aumentar a sensibilidade e especificidade, e simplificar o teste pela automação. Cada método possui suas vantagens, entretanto o impacto de cada método individualmente ainda não está determinado (Roth *et al.* 1997).

O FDA americano (The Food and Drug Administration) aprovou no final da década de 90 dois testes comerciais para amplificação de ácidos nucléicos para detecção direta do *M. tuberculosis* Direct Test (E-MTB; Gen-Probe, San Diego, CA) e Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems, Inc. Branchburg, NJ). A identificação através da seqüência rRNA 16S tem sido bastante utilizada e levou ao desenvolvimento de testes

rápidos (kits) sendo comercialmente produzidos pela Gen-Probe Inc. (San Diego, Califórnia, U.S.A.), mostrando alta sensibilidade (cerca de 95%) na identificação do complexo *M. tuberculosis*, do MAC, *M. goodnae* e *M. kansasii* (Frothingham & Wilson 1993).

Reação em Cadeia da Polimerase

Desde a primeira aplicação no diagnóstico da TB em 1989 por Bisson-Noel, a PCR tem sido a técnica mais utilizada para amplificação de ácidos nucleicos de micobactérias (Roth *et al.* 1997). A PCR permite amplificar especificamente pequenos fragmentos de DNA em um termociclador, com ciclos em diferentes temperaturas, cuja sequência alvo esteja presente em uma quantidade de 1 picograma. Para isso utilizam-se primers que se hibridizam com sequência alvo complementar, a enzima DNA polimerase faz a extensão da fita de DNA em conjunto com oligonucleotídeos individuais que formam a nova fita de DNA; além de co-fatores ou substratos para a reação. A cada ciclo a quantidade de DNA é dobrada, possibilitando a amplificação do segmento em questão. Atualmente a técnica de PCR está bem desenvolvida e vem sendo extensivamente utilizada para o diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas (Nagesh *et al.* 2001).

A PCR permite variações de técnicas, como por exemplo, a PCR-Nested, na qual se usam pequenos primers que se enquadram dentro de uma sequência previamente amplificada, permitindo uma reamplificação de ácidos nucleicos a partir do produto do primeiro ciclo de PCR. Esta técnica é bastante específica e muito sensível, embora seja passível de contaminação (Roth *et al.* 1997).

Sabe-se que a realização das técnicas de biologia molecular, como a PCR em material fixado em formol e embocado em parafina apresenta limitações e resultados variados, pois devido ao processamento do tecido podem ocorrer alterações físicas e químicas no DNA, afetando a sensibilidade e especificidade da PCR (Salian *et al.* 1998). Nos casos de micobacterioses, a realização da PCR em

material parafinado é particularmente importante em casos em que houve falha em cultura microbiológica ou nos casos sem evidências clínicas da doença onde não foram coletados materiais para cultura (Marchetti *et al.* 1998, Salian *et al.* 1998). Preparações de formol tamponado e não tamponado podem inibir a eficiência da PCR e diminuir a sensibilidade da técnica (Fiallo *et al.* 1992; Ohara *et al.* 1992; Greer *et al.* 1991; Impraium *et al.* 1987). Em experimento realizado por Rish *et al.* (1993) em tecido pulmonar de rato experimentalmente infectado por uma cepa padrão de *M. tuberculosis*, embebido em parafina, detectou-se cerca de 9 microrganismos em um corte de tecido com 5 µm de espessura. De acordo com Salian *et al.* (1998) fixação em formol tamponado por mais de sete dias parece ter efeito insignificante na sensibilidade do ensaio.

Marchetti *et al.* (1998) compararam a sensibilidade e especificidade de 4 ensaios de PCR nested para detecção de *M. tuberculosis* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. O primeiro ensaio amplificou uma região do segmento mtp40 específico para o *M. tuberculosis*; o segundo amplificou uma pequena região do gene que codifica um antígeno de 45-KDa e que é altamente conservado dentro das espécies de micobactérias; o terceiro e quarto ensaios amplificaram a mesma seqüência de inserção, a IS6110 que está usualmente representada em múltiplas cópias dentro do genoma do “complexo *M. tuberculosis*”, entretanto com primers diferentes. Os autores encontraram melhores resultados de sensibilidade e especificidade para os dois últimos ensaios, entretanto os resultados foram mais satisfatórios para o quarto ensaio, no qual os produtos amplificados eram menores. Com esses resultados os autores concluíram que a IS6110 parece ser um bom alvo para a amplificação de DNA em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina.

Vago *et al.* (1998) a partir da realização da PCR nested para identificação do *M. tuberculosis* com fragmento interno de 123pb em material parafinado de nódulos linfáticos, propuseram ser esse um método simples e de alta sensibilidade para o diagnóstico em material parafinado.

Hsiao *et al.* (2003) realizaram reações de PCR em amostras de pele emblocadas em parafina, que possuíam áreas de inflamação crônica granulomatosa sem evidências de BAAR na coloração de ZN. De 32 casos estudados, 22 foram positivos para a seqüência de inserção IS6110. Os quatro casos restantes foram considerados como micobacteriose atípica. Desta forma os autores mostraram que a PCR permite uma detecção sensível e rápida em lesões paucibacilares de pele fixadas em formol e emblocada em parafina.

Ardeleanu *et al.* 1999 analisaram através da PCR 7 amostras de pulmão e 33 espécimes extrapulmonares. Os ensaios de PCR através da IS6110 mostraram positividade em 77, 5% dos casos, mostrando boa aplicação dessa técnica para uma rápida detecção das MBT.

Seqüência de Inserção (IS)

Seqüências de inserção são seqüências repetitivas localizadas nas extremidades de elementos de transposição ou “transposons”, que são segmentos de DNA que podem se transferir de uma região para outra do genoma. As ISs normalmente possuem entre 750 e 2500 pb. Elas são flanqueadas por repetições invertidas de 10 a 40 pb. Uma IS simples contém uma enzima transposase, flanqueadas por repetições invertidas curtas (IRs). As IRs formam um bloco de seqüências similares orientadas em direções opostas e são elas que são reconhecidas pela transposase nas etapas iniciais de transposição (Liebert *et al.* 1999). As seqüências de inserção (ISs) são espécie-específicas e podem ser utilizadas para identificá-las (Leão *et al.* 1999). Muitas seqüências de inserção tem sido utilizadas para identificação de diferentes espécies de *Mycobacterium*.

Para a identificação do “complexo *M. tuberculosis*”, a seqüência de inserção IS6110 é muito utilizada, ocorre de 1 a 20 cópias por célula e é considerada alvo ideal para a amplificação (Roth *et al.* 1997).

Já para a identificação do “complexo *M. avium*” 11 elementos de inserção tem sido utilizados na sua identificação: IS900 no *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, IS901 e IS1110 no *M. avium*, IS1141 no *M. intracellulare* e

posteriormente IS1245 que está presente em múltiplas cópias no genoma de cepas de *M. avium* isoladas de material clínico (van Soolingen *et al.* 1998; Guerrero *et al.* 1995).

Sangari *et al.* (2000) descreveram a IS666 como sendo restrita ao *M. avium*, presente em 21% de isolados variando entre 1 a 7 cópias, ao contrário da IS1245 que apresenta uma média aproximada de 20 cópias, oferecendo um alto poder discriminatório.

A IS1245 é específica para o *M. avium*, contém 1313pb e codifica uma trasposase, tendo sido descrita por Guerrero *et al.* (1995). Existe uma alta homologia dessa seqüência com a IS1085, encontrada em *M. bovis*. Ambas pertencem a família de seqüências relacionadas ao elemento IS256, descoberta em *Staphylococcus aureus* (McAdam *et al.* 2000; Guerrero *et al.* 1995). Treze seqüências de inserção micobacteriana (IS1081, IS6120, IS1245, IS1311, IS1395, IS1407, IS1408, IS1511, IS1512, IS2606, IS1553, IS1554 e IS1552) foram identificadas como membros desta família (McAdam *et al.* 2000). Estudos prévios têm demonstrado que a IS1245 é realmente uma seqüência estável nas espécies de *M. avium* (Pestel-Caron & Arbeit 1998; Picardeau & Vincent 1996).

Muitos são os trabalhos utilizando a IS1245 como marcador molecular para identificação do *M. avium*, parecendo ser esta, até o momento, a mais utilizada e com resultados satisfatórios na identificação do *M. avium*. Ferreira *et al.* (2002) encontraram positividade de 96%, dos casos que foi realizada PCR para amplificação da IS1245, ou seja, de 49 amostras 47 mostraram positividade para IS1245 de amostras de líquido pleural, catarro e de lavado bronco alveolar.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Analisar os aspectos histopatológicos de 59 e 16 casos de micobacteriose pulmonar em pacientes autopsiados com e sem AIDS, respectivamente.
2. Avaliar imunohistoquimicamente o perfil imunológico da resposta inflamatória crônica granulomatosa nas áreas de micobacteriose pulmonar em ambos os grupos.
3. Identificar as espécies de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* usando a técnica de PCR em 20 casos de micobacteriose pulmonar emblocados em parafina distribuídos igualmente entre os grupos de pacientes autopsiados com e sem AIDS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Neste trabalho foram estudados as amostras de pulmões com MB obtidas de 75 pacientes autopsiados com TB e comorbidade AIDS/TB, separados em dois grupos: grupo I TB e grupo II AIDS/TB no período de 1975 a 2004, no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SVOC-FMUSP), mediante autorização do Departamento de Patologia da FMUSP e aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - CAPPesq. Os casos foram selecionados a partir do arquivo do SVOC - FMUSP.

4.2. Dados obtidos dos prontuários hospitalares

Os dados clínicos referentes aos pacientes selecionados neste estudo foram obtidos a partir da análise das informações presentes nos prontuários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, quanto à idade, gênero, causa *mortis* e dados referentes à cultura micobacteriana nesses pacientes.

4.3. Colorações Histoquímicas

Todos os casos de micobacteriose pulmonar foram revisados mediante obtenção de cortes histológicos 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina & Eosina e Ziehl-Neelsen para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes.

4.4. Reações Imunohistoquímica

Foram realizadas reações imunohistoquímicas com a finalidade de se avaliar o padrão de resposta inflamatória bem como a positividade para o bacilo.

As reações foram efetuadas no laboratório de Patologia da FOP/UNICAMP que seguiu o seguinte protocolo: inicialmente foram obtidos cortes parafinados de

3µm de espessura e montados em lâminas silanizadas. Em seguida foi realizada a primeira desparafinização em xilol por 10 minutos, segunda desparafinização em xilol por 10 minutos. Seguiu-se a hidratação dos cortes em etanol absoluto, etanol a 90%, etanol a 70%, etanol a 50% e lavagens em água corrente e destilada. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (10 volumes) em 5 banhos de 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas, com solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 em dois ciclos de 12 minutos cada, em potência máxima (750W), deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente, seguido por lavagens em água corrente e destilada e solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). Posteriormente realizou-se a incubação com o anticorpo primário diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens em solução de PBS.

Para cada anticorpo foi utilizada a seguinte diluição: anti-BCG (*Micobacterium bovis*, Dako, código PO124, 1:10000); CD8 (Dako, clone MxH, 1:100); CD20 (Dako, clone L26(1,2), 1:10000); CD4 (CD45 RO, clone OPD4, 1:100); CD 68 (Dako, clone PG-M1, 1:400) e CD 15 (Granulócitos Leucocitário, C3D-1, 1:20). As lâminas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Strept ABC Complex/Hrp Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 30 minutos a 37°C na diluição de 1:500, seguido de 3 lavagens em tampão PBS. Após isso, as lâminas foram incubadas com complexo Streptavidina – Biotina (Dako) por mais 30 minutos, e reveladas com substrato cromogênico (3,3 diaminobenzidina – DAB, Sigma), 120 mg por 100 ml de PBS mais 2 ml de água oxigenada 10 volumes por 5 minutos a 37°C, seguido por lavagens em água corrente e destilada. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Carrazzi por 3 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Os cortes foram desidratados em 3 banhos de álcool absoluto, seguido pela diafanização em xilol por 3 minutos em novo xilol e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá.

4.5. Análise histomorfométrica

As lâminas submetidas às reações imunohistoquímicas para determinação do padrão da resposta inflamatória foram analisadas em sistema de imagem (System KS-400 versão 2.1 Carl Zeiss, Alemanha).

A imunoreatividade do componente inflamatório para os anticorpos CD4, CD8, CD15, CD20 e CD68 foi quantificado através de contagens de células positivas em 10 campos de 21.208, 57 μm^2 em áreas periféricas às áreas de necrose. A mesma região de cada caso foi analisada para todos os anticorpos. A imunopositividade para o bacilo foi avaliada mediante observação direta em microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha).

Foi realizado teste T de student para avaliar a significancia do componente inflamatório entre os dois grupos.

4.6. Método molecular

4.6.1. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas em 20 casos de MBPs, sendo 10 do grupo I e 10 do grupo II. Após a obtenção dos cortes para realização das colorações histoquímicas e imunohistoquímicas, foram obtidos 10 cortes de 5 μm em fita única de cada bloco de parafina que foram depositados em tubos de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf).

Tomou-se o cuidado de trocar as navalhas e de desinfetar com álcool 70% as pinças depois do corte de cada bloco para evitar contaminação.

Inicialmente, as amostras foram desparafinizadas adicionando-se 1,0 ml de xilol ao tubo. Em seguida, o tubo foi agitado no vortex por 2-5 segundos, deixando descansar por 5 minutos. A seguir foi centrifugado a 14000 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente em uma microcentrífuga (Eppendorf). O sobrenadante foi então removido com uma micropipeta de 200 μl (Rainin) com ponteiros esterilizados e a operação repetida.

Em seguida, foi adicionado 1,0 ml de etanol absoluto (Merck) e agitou-se no vortex por 2-5 segundos e novamente centrifugado nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante foi removido com micropipetas de 200 μl (Rainin)

com ponteiros esterilizados e a operação novamente repetida. Foi adicionado 1 ml de álcool 70% e agitou-se no vortex por 2-5 segundos, seguido, novamente de centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi desprezado e o excesso removido com pipeta. Foi novamente feita uma breve centrifugação (Spin) e cuidadosamente removido o restante de álcool. O tubo foi mantido aberto por mais 10 minutos para uma completa evaporação do álcool. Após esse período e na ausência de odor alcoólico, foi acrescentado 450µl de Tampão Tris-EDTA pH 8,0, 50µl Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% e 15µl de proteinase K a 20 mg/ml (Gibco BRL). Os tubos foram então mantidos por um período de 16 horas em banho-maria entre 50 e 55°C.

Após esse período o conteúdo deveria estar totalmente líquido e não viscoso e iniciou-se a extração de DNA propriamente dita através da utilização de 2 solventes orgânicos: Fenol e Clorofórmio. Adicionou-se o volume aproximadamente da soma dos 3 reagentes adicionados anteriormente Tampão Tris-EDTA + SDS + Proteinase K, portanto 500µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamínico (25:24:1 Gibco BRL). Agitou-se no vortex por 2 minutos, a amostra descansou por 5 minutos e em seguida foi feita a centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga. Após a centrifugação observamos a formação de 3 fases dentro do tubo, sendo a de maior densidade (fundo do tubo) correspondente ao fenol, seguida pela fase intermediária ou orgânica (restos celulares digeridos) e pela fase aquosa que corresponde ao DNA extraído. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf) estéril com auxílio pipeta de 200µl e ponteiros esterilizados, tomando o cuidado de não tocar na fase intermediária ou orgânica, sendo o restante desprezado. Procedeu-se da mesma forma repetindo a etapa anterior. Após a transferência novamente, da fase aquosa para outro tubo, adicionou-se 500µl de clorofórmio (Merck), o tubo foi agitado no vortex por 2-5 segundos, deixado descansar por 5 minutos e então centrifugado nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo onde iniciou-se a precipitação de DNA mediante a

adição de 0,02 volume de Cloreto de Sódio 5M e 2,5 volume de etanol absoluto (Merck). O tubo foi deixado precipitando durante a noite a -20°C.

Após esse período foi realizada uma centrifugação a 1000 rpm a 0 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o excesso cuidadosamente removido com pipeta. Adicionou-se 1 ml de etanol a 75% gelado e realizada novamente a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o tubo mantido aberto por 10 minutos para evaporação do álcool. Por fim foi adicionado 50µl de tampão Tris-EDTA pH 8,0. Em seguida foi realizada a quantificação através da espectrofotometria (Spectronic Genesys 2) em 260nm e 280nm, obtendo-se portanto a concentração e o grau de pureza do DNA pela relação 260/280nm.

4.6.2. Controles Positivos

Para as reações de PCR foram utilizados controles positivos e negativos em cada reação.

Para a amplificação da IS6110, presente no genoma do complexo *M. tuberculosis* foi utilizado o DNA extraído da cepa padrão MT 14323, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP), já utilizada em outra pesquisa feita em nosso laboratório (Rangel *et al.* 2005).

Para a amplificação da IS1245, presente no genoma do *M. avium* e suas sub espécies, foram utilizadas 2 controles internos: DNA extraído de cepa padrão IWGMT49 e DNA extraído de linfonodos mesentéricos de suínos infectados por *M. avium* emblocados em parafina. O DNA extraído da cepa padrão IWGMT49 também gentilmente cedido pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP). Já o bloco de parafina foi gentilmente cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Suínos e Aves), também já utilizado em outra pesquisa

no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) (Rangel *et al.* 2005).

Como controle negativo foi utilizado DNA extraído de um carcinoma espinocelular bucal.

4.6.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas no laboratório de biologia molecular da área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Foram utilizados três conjuntos de primers, sendo o primeiro para detecção do gênero *Mycobacterium* através da PCR Nested (Ensaio PCR 1), o segundo para a detecção do “complexo *M. tuberculosis*” também através da PCR Nested (Ensaio PCR 2) e o terceiro para detecção da espécie *M. avium* através de PCR simples (Ensaio PCR 3). O primeiro conjunto de primers possibilita a amplificação de pequena região de gene responsável pela codificação de proteínas antigênicas de 65 kDa (Proteína de choque térmico) conservadas entre as espécies de *Mycobacterium*. Os primers externos amplificam um fragmento de 234pb sendo a seqüência de primer sense: AGGCGTTGGTTCGCGAGGG e antisense: TGATGACGCCCTCGTTGCC. Os primers internos amplificam um fragmento de 142pb sendo a seqüência do primer sense: CCAACCCGCTGGTCTCAA e antisense: CCGATGGACTGGTCACCC.

O segundo conjunto de primers possibilita a amplificação de segmento da seqüência de inserção IS6110 que permite a identificação do “complexo *M.tuberculosis*”. Os primers externos amplificam os segmentos de 220pb sendo a seqüência do primer sense: CGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCGCAGGAC e antisense: CATCGTGGAAGCGACCCGCCAGCCCAGGAT. Os primers internos amplificam um fragmento de 123pb sendo a seqüência do primer sense: CCTGCGAGCTAGGCGTCGG e antisense: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG.

As PCRs realizadas com os dois conjuntos de primers citados anteriormente foram baseadas nos protocolos descritos por Marchetti *et al* (1998). Entretanto, o terceiro conjunto de “primers” usado para detecção da espécie *M.*

avium, foi delineado no laboratório de Biologia Molecular da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), usando o programa “Amplify 1.2” (Universidade de Wisconsin, Madison, E.U.A) (Rangel *et al.* 2005). Os primers sintetizados amplificam um segmento de 106pb da IS1245, específica para *M. avium*. A IS1245 foi obtida a partir do “Gene Bank” (NCBI –“National Center for Biotechnology Information” NIH, E.U.A - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do número de acesso L33879. A seqüência de primers sense é: TGGACCAGTCTGCCTT e antisense: CGTCGTAAGGCTTGGTAG. Os primers já foram checados quanto a sua especificidade comparando-os com todas as seqüências já identificadas e presentes no “Gene Bank”(NCBI –“National Center for Biotechnology Information” NIH, E.U.A - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) em outros experimentos.

Foram realizadas reações de PCR de 50 µl de 10X PCR Buffer, 3µl de 50mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1µl de 10mM dntp Mix, 1µl cada primer (sense em antisense) diluídos na concentração de 10mM e 0,5µl de Taq DNA polimerase 5U/ µl (Invitrogen, Life technologies, Brasil). A quantidade de DNA utilizada foi de 3µg para os Ensaio de PCR 2 e 3, e para o Ensaio de PCR 1 foi utilizado 2µg de DNA. A quantidade de DNA utilizada para os controles positivos de cepas padrão foi de 10ng e para os controles positivos e negativos de material parafinado foi de 2µg. Água Milli-Q autoclavada foi adicionada para completar o volume final de 50µl. Este protocolo foi realizado no 1° ciclo das reações de Nested PCR, e no único ciclo da amplificação para a IS1245. Já para o 2° ciclo das reações de Nested PCR foram montadas reações de 50µl contendo 5µl de 10X PCR Buffer, 3µl de 50mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1µl de 10 mM dntp Mix, 1µl de cada primer interno (sense e antisense) diluídos na concentração de 10 µM e 0,5µl de Taq DNA polimerase 5U/µl (Invitrogen, Life technologies, Brasil). Foram adicionados 15µl do produto do primeiro ciclo e água Milli-Q autoclavada para completar o volume final de 50µl. As condições do primeiro ciclo da PCR 1 foi: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para o segundo ciclo de

PCR: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. As condições do primeiro ciclo para amplificação da IS6110 foi: 94°C por 4 minutos, 20 ciclos de 94°C por 1,3 minutos, 63°C por 1,3 minutos, 72°C por 1,3 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para o segundo ciclo: 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1,3 minutos, 72°C por 1,3 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para a amplificação da IS1245 foram 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos.

Quinze microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforeticamente em géis de poliacrilamida não desnaturantes a 8% e corados por Brometo de Etídio por 15 minutos.

5. RESULTADOS

5.1 Dados Clínicos e Epidemiológicos

A tabela 01 mostra os dados dos 16 pacientes com TB com relação ao sexo, idade, causas *mortis* e principais achados na Folha Frontal Padrão. A idade dos pacientes do grupo I (TB) variou de 1 a 62 anos com média de idade de 28,52 anos \pm 18,21 anos. Onze pacientes pertenceram ao gênero masculino e 5 ao gênero feminino. As principais causas *mortis* nesse grupo foram TB pulmonar, insuficiência respiratória, e choque séptico.

Tabela 01. Dados dos 16 pacientes com TB autopsiados em relação à idade, gênero, causa *mortis* e principais achados na Folha Frontal Padrão.

Caso	Idade	Gênero*	Causa (s) <i>mortis</i>	Principais achados na folha central
1) N75/149	11	M	TB** Pulmonar	I) TB Pulmonar
2) N77/231	43	M	TB Pulmonar	I) TB Pulmonar II) Alcoolismo Crônico III) Cirrose hepática microgoticular IV) Arteriosclerose da aorta e ramos principais
3) N77/1019	27	M	TB pós-primária	I) TB pós-primária
4) N80/1064	39	M	TB pulmonar pós-primária	I) TB pulmonar pós-primária II) Bronquite crônica III) Broncopneumonia
5) N83/087	52	M	TB Pulmonar	I) TB Pulmonar II) Disseminação ganglionar III) Ateromasia IV) Fibrose de Tireóide
6) N83/121	23	F	Insuficiência respiratória	I) TB miliar II) TB ganglionar III) Corticoterapia IV) Pancreatite crônica V) Serosite crônica VI) Hipertensão arterial

7) N83/609	43	M	Insuficiência respiratória	I) TB pulmonar do adulto
8) N83/1488	1	M	Choque séptico	I) Hidrocefalia II) TB pulmonar produtiva caseosa III) Necrose tubular aguda em fase inicial
9) N84/824	62	F	Edema Cerebral Necrose Isquêmica cerebral	I) TB pulmonar II) Adenocarcinoma bem diferenciado de intestino grosso III) Colestase intra-hepática
10) N84/1251	48	M	Choque séptico	I) TB miliar exudativa
11) HC85/510	23	M	Insuficiência respiratória	I) TB pulmonar progressiva do adulto II) Broncopneumonia abscedada por cocos gram -
12) HC88/673	21	F	Indeterminado	I) Lupus eritematoso sistêmico II) Alterações secundárias a imunodepressão • Depleção linfocitária • TB miliar III) Choque séptico
13) HC88/886	31	M	Embolia Pulmonar	I) TB miliar
14) HC89/245	29	F	Choque	I) TB miliar II) Desnutrição III) Diverticulose (Meckel) em intestino delgado
15)HC93/1368	36	F	TB	I) TB pulmonar II) Nódulo renal
16) HC03/828	57	M	Caquexia TB miliar pulmonar	I) TB miliar II) Candidose oral III) Aterosclerose de aorta

* Gênero: M - masculino; F- feminino; ** TB – Tuberculose.

A tabela 02 mostra os dados dos 59 pacientes com TB/AIDS com relação ao sexo, idade, causas *mortis* e principais achados na Folha Frontal Padrão. No grupo II (TB/AIDS) a idade dos pacientes variou entre 17 e 63 anos, com média de idade de 36,2 anos \pm 10,36 anos. Dos 59 pacientes desse grupo, 44 eram do gênero masculino e 15 do gênero feminino. As principais causa *mortis* nesse grupo foram: broncopneumonia, septicemia, tb miliar, insuficiência respiratória e choque séptico.

Tabela 02. Dados dos 59 pacientes com TB/AIDS autopsiados em relação à idade, gênero, causa *mortis* e principais achados na Folha Frontal Padrão.

Caso	Idade	Gênero*	Causa (s) <i>mortis</i>	Principais achados na folha central
01) N85/278	33	F	Septecemia	I) TB** miliar II) AIDS
02) N85/384	28	M	Indeterminada	I) AIDS II) TB miliar
03) HC86/669	31	M	Septicemia	I) AIDS • Micobacteriose disseminada
04) HC87/607	32	F	Broncopneumonia	I) AIDS • TB pulmonar e TB miliar • Broncopneumonia terminal II) Alcoolismo crônico III) Miocardite crônica discreta IV) Tromboembolismo terminal V) Choque terminal
05) HC87/1397	26	M	Indeterminado	I) Linfoma maligno indeterminado II) Homossexualismo • HIV+ III) Lesões granulomatosas em pulmões
06) HC87/1649	34	M	TB miliar	I) AIDS • TB miliar
07) HC89/271	34	M	Septecemia	I) AIDS • Pneumonia intersticial por CMV • Micobacteriose atípica • Micobacteriose hepática • Depleção linfocitária

08) HC89/772	21	M	Meningite aguda	I) AIDS • Micobacteriose atípica
09) HC90/083	45	F	Septicemia	I) AIDS • CMV disseminada • Micobacteriose miliar atípica • Septecemia II) Enfisema pulmonar
10) HC90/310	43	M	Septicemia	I) AIDS • Micobacteriose miliar atípica • Depleção linfocitária II) Nefrite intersticial focal III) Bronquite crônica IV) Enfisema
11) HC90/1098	32	F	Broncopneumonia	I) AIDS • TB miliar • Depleção linfocitária II) Obstrução baixa de vias urinárias
12) HC91/0115	17	F	Indeterminada	I) AIDS • TB miliar • Pancitopenia • Esteatose hepática • Monilíase oral II) Embolia pulmonar terminal
13) HC91/1311	37	M	AIDS	I) AIDS • TB miliar II) Adenoma crônico III) Adenoma do córtex-renal
14) HC91/1347	25	M	AIDS	I) AIDS • Lesões granulomatosas disseminadas
15) HC91/1562	59	M	Septicemia	I) AIDS
16) HC92/440	29	M	Indeterminada	I) AIDS • TB pulmonar • Candidose oral • Depleção linfóide II) Alcoolismo
17) HC92/950	29	F	AIDS	I) AIDS • Criptococose SNC • TB miliar • Broncopneumonia

18) HC92/1034	25	F	AIDS	I) AIDS • perda da imunidade celular • TB pulmonar
19) HC92/1121	33	M	TB miliar	I) AIDS • TB pulmonar e miliar • Sarcoma de Kaposi II) Arteriosclerose coronária discreta
20) HC92/1381	32	F	Insuficiência respiratória aguda	I) AIDS • TB pulmonar • CMV II) Infarto esplênico III) Palidez renal bilateralmente
21) HC93/036	27	M	Enterocolite aguda	I) AIDS II) TB pulmonar com disseminação aguda III) Enterocolite aguda
22) HC93/384	33	F	Indeterminada	I) AIDS • TB miliar • Emagrecimento • Diarréia • Sangramento trato gastro-intestinal
23) HC93/1309	31	M	AIDS	I) AIDS • TB miliar • Broncopneumonia • Caquexia
24) HC94/285	33	M	AIDS	I) AIDS • diarréia e vômito • pneumopatia • disseminação miliar • broncopneumopatia • septicemia
25) HC94/992	42	M	AIDS	I) AIDS • TB miliar II) Hepatopatia crônica III) Dilatação ventrículo direito e esquerdo
26) HC94/1441	33	F	AIDS	I) AIDS • TB miliar

				<ul style="list-style-type: none"> • Plaquetopenia II) Cervicite crônica III) Dilatação cardíaca global
27) HC95/379	34	M	AIDS	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • Septecemia – CMV • Lesões granulomatosas, padrão miliar • Sarcoma de Kaposi • Linfoma não-Hodking
28) HC96/039	47	M	Insuficiência respiratória aguda	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • Linfoma em SNC • Pneumopatia intersticial • Miobacteriose miliar • Endocardite infecciosa
29) HC96/1471	34	F	Choque séptico	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS II) TB miliar III) Septecemia
30) HC96/1525	30	M	TB miliar	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS II) TB miliar
31) HC97/232	48	M	Insuficiência respiratória	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • TB miliar • Infecção pulmonar por <i>S aureus</i>
32) HC97/358	24	M	Insuficiência respiratória	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS II) TB miliar
33) HC97/393	43	M	Insuficiência respiratória	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • TB pulmonar • TB miliar • Encefalopatia do HIV • Candidose oral
34) HC98/221	27	M	Septicemia	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS II) TB miliar
35) HC98/1375	47	M	Choque	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • TB miliar • Choque • Plaquetomia
36) HC99/100	39	M	TB disseminada	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • TB miliar
37) HC99/688	50	M	Septicemia	<ul style="list-style-type: none"> I) AIDS • Broncopneumonia • TB miliar

				II) Alcoolismo crônico III) Arteriosclerose leve IV) Cistite aguda com ptéquias
38) HC99/1041	21	M	TB miliar	I) AIDS II) Micobacteriose miliar
39) HC00/13	34	F	TB miliar AIDS	I) AIDS • Meningite criptocócica • TB pulmonar bilateral
40) HC00/70	26	F	TB miliar	I) AIDS II) Micobacteriose miliar
41) HC00/476	42	M	Insuficiência respiratória	I) AIDS • TB pulmonar disseminada II) Palidez visceral generalizada
42) HC00/764	36	M	Broncopneumonia AIDS	I) AIDS • TB disseminada • Medula óssea hipocelular • Sarcoma de Kaposi
43) HC00/1314	24	M	TB miliar Choque séptico	I) AIDS • TB miliar
44) HC01/671	31	M	Síndrome da Angústia Respiratória	I) AIDS • TB miliar
45) HC01/739	42	M	AIDS	I) AIDS • TB miliar • Candidose trato gastrointestinal • Hepatite C II) Arteriosclerose generalizada
46) HC01/741	63	M	TB miliar	I) AIDS • TB miliar • Choque séptico • Linfadenopatia crônica relacionada a AIDS II) Hipertensão arterial III) Antracose pulmonar e linfonodal IV) Etilismo
47) HC01/804	39	M	TB pulmonar Disseminação miliar	I) AIDS II) TB com disseminação miliar com disseminação para pulmão, baço, peitônio, linfonodos e fígado

				II) Arteriosclerose
48) HC01/869	52	M	Broncopneumonia	I) HIV + II) TB miliar III) Arteriosclerose IV) Esteatose renal
49) HC01/1098	41	M	Septicemia Isquemia intestinal TB disseminada AIDS	I) AIDS • Imunodepressão II) Lesão isquêmica intestinal
50) HC02/122	62	M	Peritonite Tuerculosa TB pulmonar AIDS	I) AIDS • TB disseminada • Diminuição dos folículos linfóides em linfonodos e baço II) Antracose
51) HC02/355	43	M	Choque séptico TB miliar AIDS	I) AIDS • Micobacteriose miliar II) Arteriosclerose generalizada III) Colesterolose em vesículas biliar
52) HC02/373	20	M	Septicemia TB miliar AIDS	I) AIDS II) Esteatose hepática III) Prótese mamária bilateral IV) Testículos com ausência de espermatozóides e espermatogênese
53) HC02/516	34	M	TB miliar AIDS	I) AIDS • Micobacteriose disseminada • Broncopneumonia • Infarto anêmico antigo em ventrículo esquerdo
54) HC03/865	39	F	Insuficiência respiratória	I) AIDS • TB miliar II) Prolapso de valvas mitral e tricúspide III) Cisto hemorrágico tireoidiano
55) HC04/045	33	M	Pulmão de choque Choque séptico Broncopneumonia AIDS	I) AIDS • TB miliar • Medula óssea hipocelular
56) HC04/071	51	M	Insuficiência	I) AIDS

			respiratória TB miliar AIDS	<ul style="list-style-type: none"> • TB miliar • Pericardite aguda • Candidose oral • Sarcoma de Kaposi • Retinite por CMV
57) HC04/508	58	M	Sepse AIDS	I) AIDS <ul style="list-style-type: none"> • Micobacteriose pulmonar em lobo superior II) Arteriosclerose Generalizada III) Calcificação em gânglio da base
58) HC04/548	45	F	TB miliar AIDS	I) AIDS <ul style="list-style-type: none"> • TB miliar II) Adenoma de hipófise III) Leiomioma intramural de corpo uterino
59) HC04/1051	33	M	TB miliar Infecção pelo HIV	I) AIDS <ul style="list-style-type: none"> • TB miliar

* Gênero: M - masculino; F- feminino; ** TB – Tuberculose.

Em função dos dados clínicos terem sido extraídos de prontuários clínicos, muitas informações relevantes não foram encontradas nos prontuários de todos os pacientes.

O exame de cultura micobacteriana foi realizado em 62 casos, dos quais 57 apresentaram positivos.

5.1. Avaliação Histopatológica

A partir das lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina, observou-se que o parênquima pulmonar estava afetado em todos os casos. Foram analisados os padrões de granulomas existentes nos espécimes pulmonares: Granulomas bem formados (composto por área de necrose central, circundado por células gigantes tipo Langhans, epitelióides, linfócitos) (Fig. 01) e Granulomas mal formados (área de necrose caseosa com escassas células inflamatórias e ausência de células gigantes tipo Langhans) em parênquima pulmonar (Fig. 02).

Em todos os 75 casos identificou-se necrose central nos granulomas, variando desde pequena área focal até extensas áreas necróticas.

Quinze casos do grupo I apresentaram padrão de granuloma bem formado, e 01 caso mostrou padrão de granuloma mal formado devido à depleção linfocitária causada por doença auto-imune. Já no grupo II, dos 59 casos, 53 (89,84%) apresentaram padrão de granuloma mal formado com extensas áreas necróticas, escassas células inflamatórias e ausência de células gigantes multinucleadas tipo Langhans. Apenas 06 casos (10,16%) apresentaram um padrão de granuloma bem formado. Dezoito casos apresentaram somente infiltrado inflamatório macrofágico. Observou-se ainda, que, quanto menor o número de células inflamatórias, maior a área de necrose e maior era a quantidade de BAAR.

A coloração de ZN foi capaz de detectar BAAR em 82,35 % dos casos do grupo I e 84,75% dos casos do grupo II. Os BAAR foram observados no interior dos macrófagos (Fig. 03), ou livres em todo parênquima pulmonar. Os casos 1 e 5 do grupo I foram negativos para BAAR. No grupo II os casos 1, 4, 5, 6, 24, 25 e 28 também apresentaram negatividade para BAAR, no entanto os casos 40 e 47 apresentaram parênquima pulmonar repleto de bacilos álcool-ácidos resistentes (Fig. 04). Simultaneamente observou-se infecção por Citomegalovírus no caso 3.

Observamos, ainda, edema, hemorragia pulmonar e antracose em 53 casos, e nos casos de diagnóstico macroscópico de reativação da TB observamos uma grande área de fibrose com escassos BAAR.

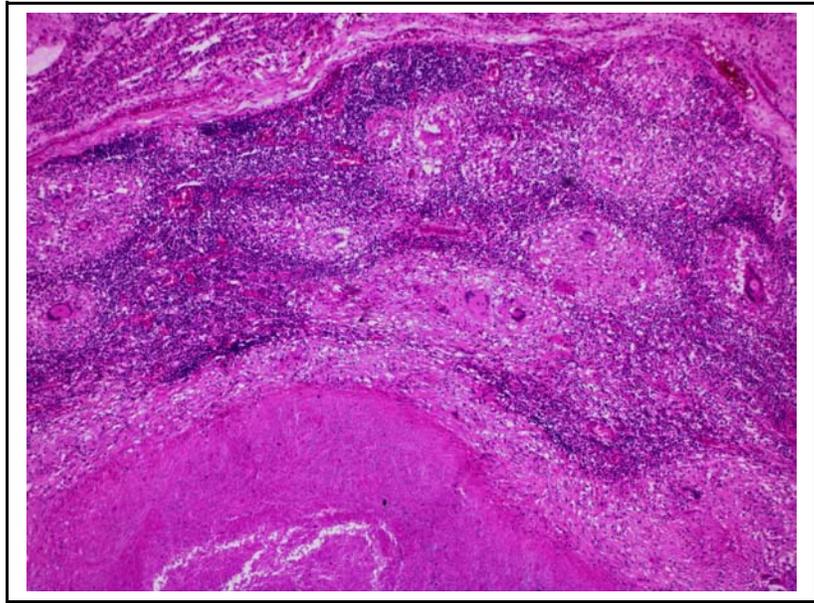


Figura 01 – Grupo I - Granuloma bem formado. Área de necrose caseosa associado a grande quantidade de infiltrado inflamatório crônico e células gigantes tipo Langhans. (H&E, 50x).

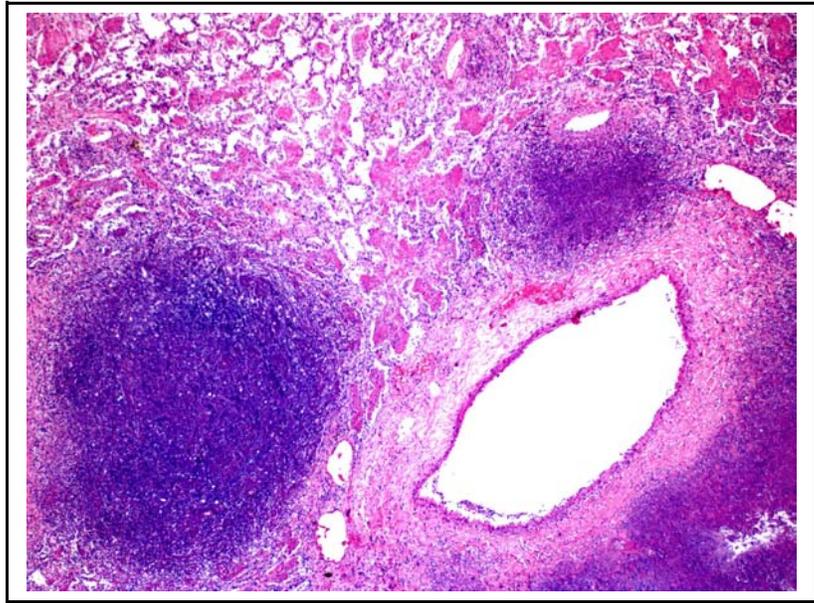


Figura 02 – Grupo II - Granuloma mal formado. Necrose caseosa com escasso infiltrado inflamatório sem presença de células gigantes tipo Langhans (H&E, 25x).

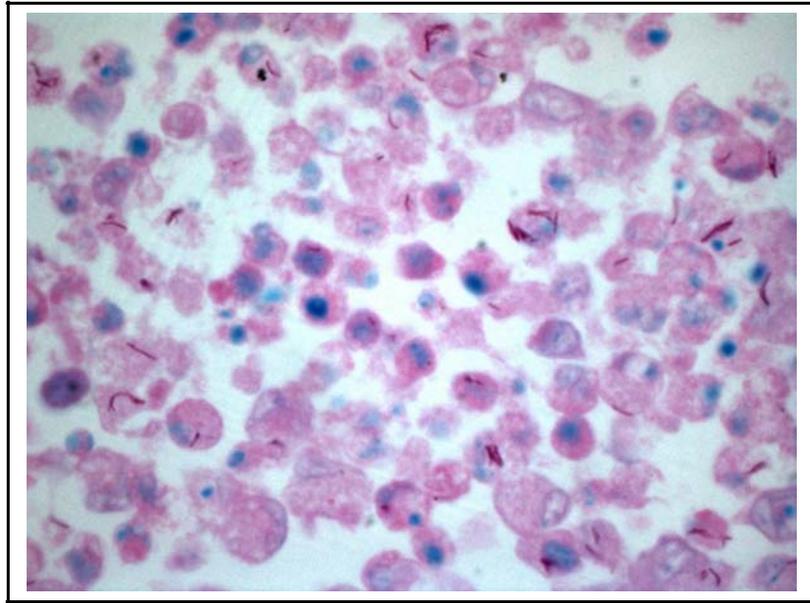


Figura 03 – Grupo I - Micobacteriose pulmonar mostrando BAAR (bacilos vermelhos) no interior dos macrófagos (Ziehl-Neelsen, 1000x).

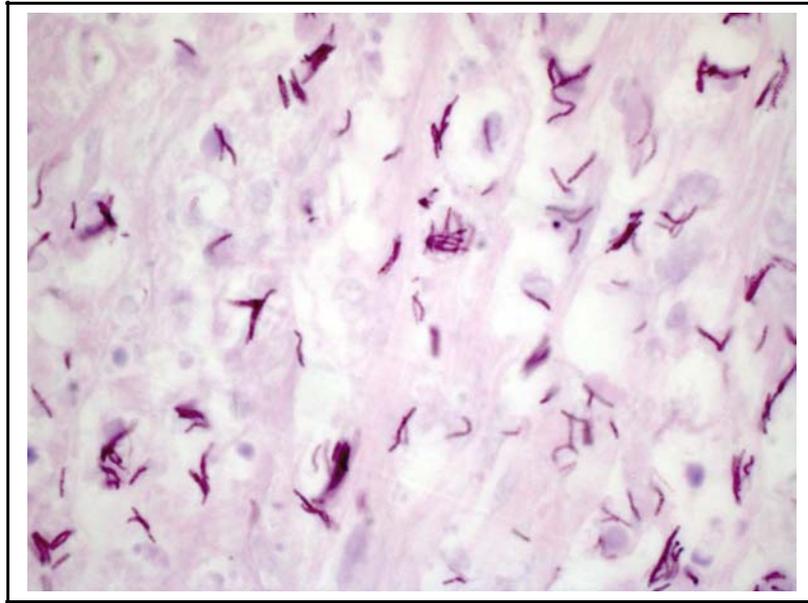


Figura 04 – Grupo II - Micobacteriose pulmonar apresentando grande quantidade de BAAR (Ziehl-Neelsen, 1000x).

5.2. Reações Imunohistoquímicas

A reação imunohistoquímica com o anticorpo primário anti-BCG (*Mycobacterium bovis*, clone PO 124 Dako®) permitiu somente a identificação do gênero *Mycobacterium spp.* nos cortes de micobacteriose analisados. Os 75 casos de micobacteriose foram positivos na reação de imunohistoquímica para o anticorpo anti-BCG (Fig. 05 e 06).

O padrão imunológico das micobacterioses pulmonares do grupo I caracterizou-se por um maior número de células positivas para o anticorpo CD4, e avaliando os tipos celulares individualmente, observou-se em ordem decrescente uma maior incidência de células TCD4 24,42 células (37,65%), seguidos por linfócitos TCD8 17,43 células (26,85%), macrófagos (CD68) 15,45 células (23,71%), linfócitos B (CD20) 4,74 células (7,31%) e neutrófilos (CD15) 2,88 células (4,4%) (Fig. 07) organizados ao redor da área de necrose.

No grupo II (AIDS/TB) o anticorpo CD 68 (macrófago) apresentou a maior positividade entre todas as células estudadas 39,05 células (50,28%), seguido por linfócitos TCD8 18,45 células (23,75%), TCD4 15,56 células (20,05%), linfócitos B 3,47 células (4,47%) e neutrófilos 1,13 células (1,45%) (Fig. 08).

No grupo I observou-se que a marcação para o anticorpo CD4 foi intensa, assim como para os linfócitos TCD8. Para o anticorpo CD68 a marcação foi esparsa. Além disso, observou-se que as áreas de marcação para os anticorpos CD15 e CD20 eram focais.

No grupo II, observamos uma menor quantidade de células inflamatórias, principalmente linfócitos tipo TCD4 com média de 15,56 células. Assim como no grupo I a marcação para os anticorpos CD15 e CD20 foram focais com média de 1,13 e 3,47 respectivamente. A marcação para CD68 foi difusa, no entanto, contamos apenas os macrófagos localizados nas regiões próximas à necrose, a média de células para esse marcador foi de 39,05 células. A marcação para linfócitos TCD8 foi de 18,45 células.

A análise estatística (teste T) mostrou resultados estatisticamente significantes apenas para os anticorpos CD4 $p = 0,0025$ para o grupo I e CD 68 $p = 0,0027$ ($p < 0,005$) no grupo II quando comparado ao grupo I. Para os demais anticorpos CD8, CD15 e CD20 encontramos os seguintes resultados: 0,2682; 0,0650; 0,3261, respectivamente.

As figuras 10 e 11 mostram o padrão imunológico dos grupos I e II respectivamente.

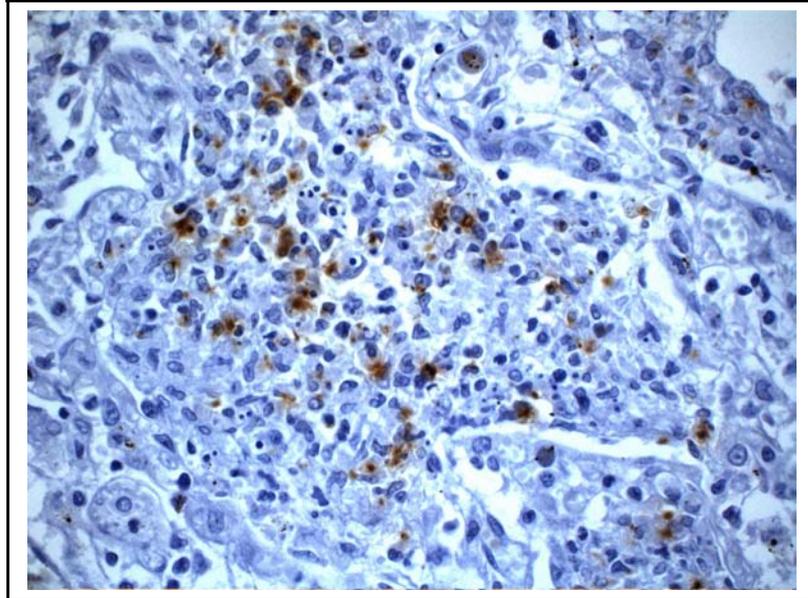


Figura 05 – Caso 08 do grupo I. Parênquima pulmonar mostrando macrófagos com bacilos (cor marron) em seu interior. (Imunoistoquímica para BCG, 400x).

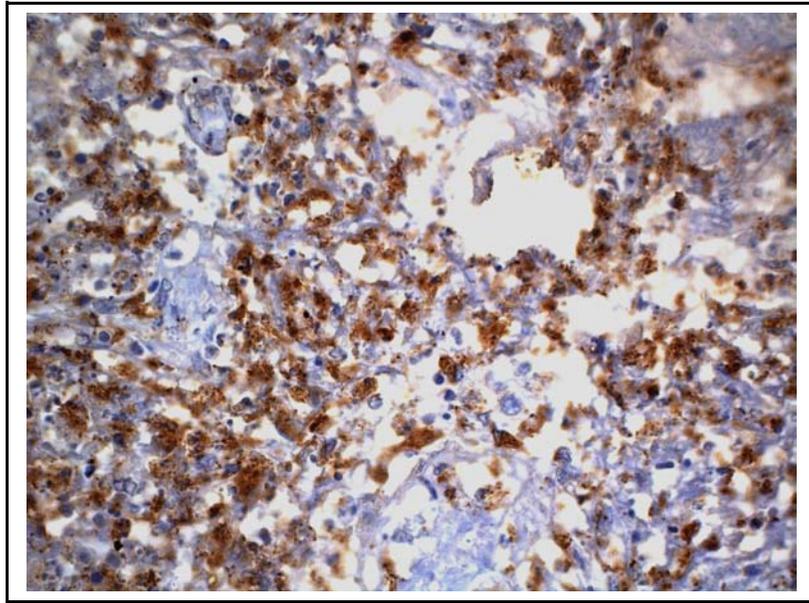


Figura 06 – Caso 47 do grupo II. Granuloma mal formado repleto de bacilos na área de necrose caseosa. (Imunoistoquímica para BCG, 400x).

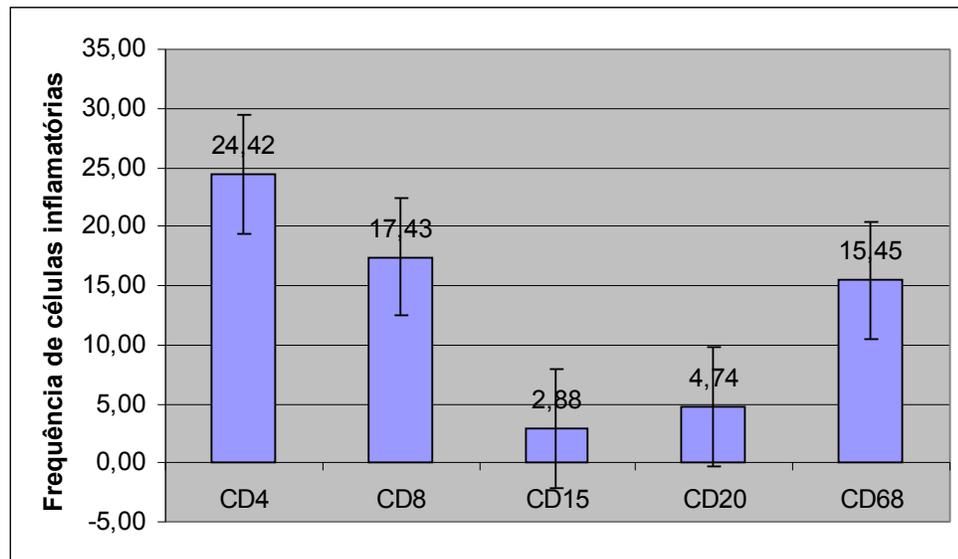


Figura 07 – Comparação entre as médias da contagem de células imunopositivas para os anticorpos CD4, CD8, CD15, CD20 e CD68 nos 16 casos analisados do grupo I.

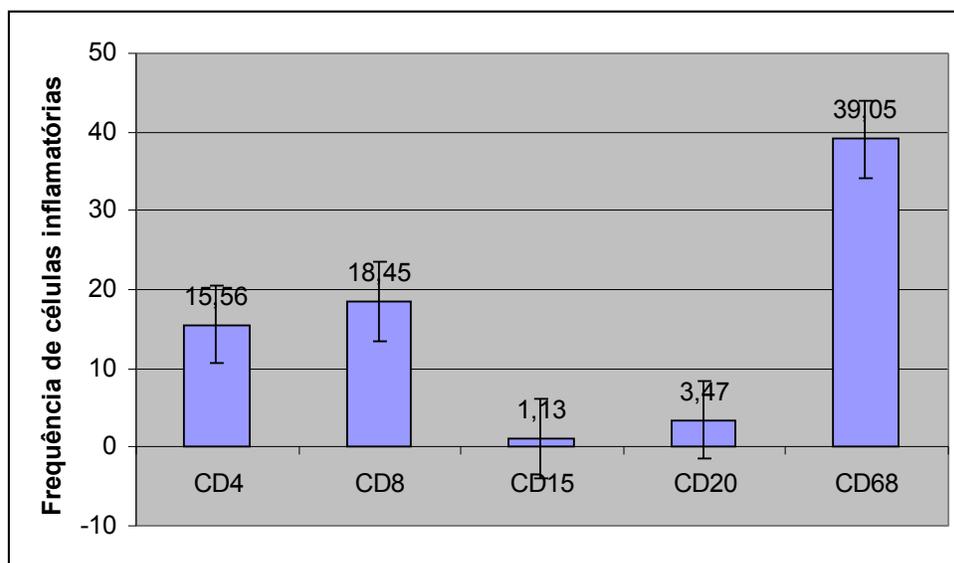


Figura 08 – Comparação entre as médias da contagem de células imunopositivas para os anticorpos CD4, CD8, CD15, CD20 e CD68 analisados do grupo II.

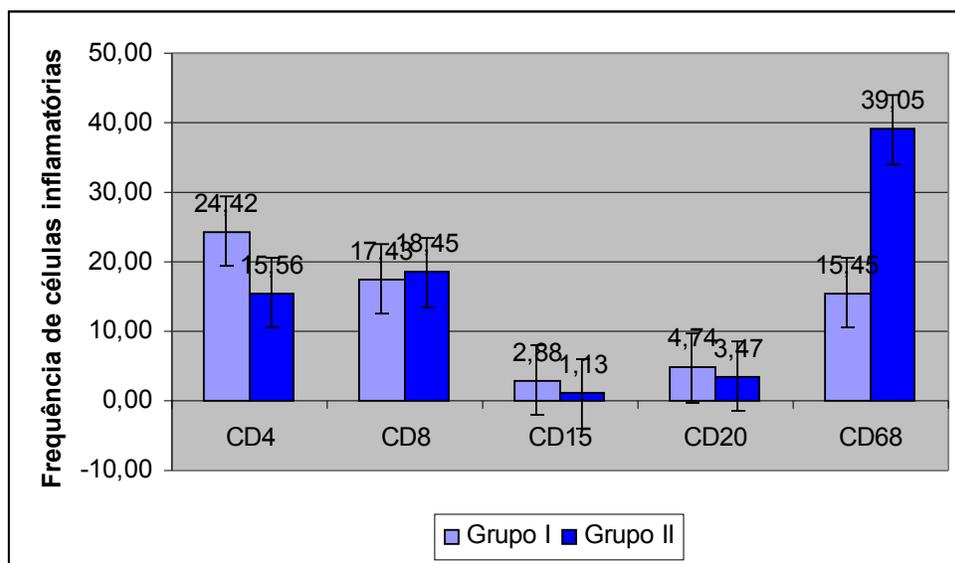
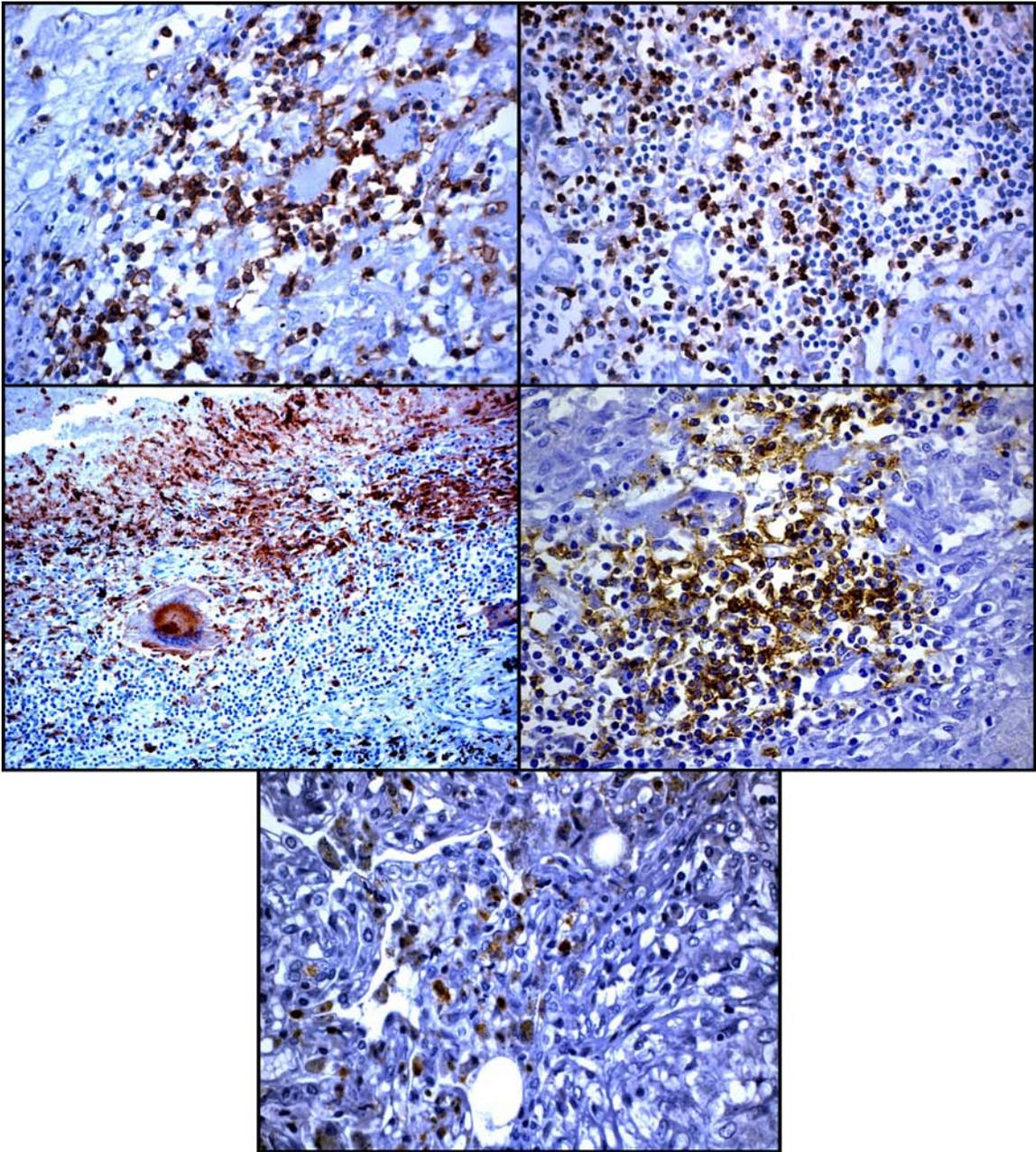


Figura 09 - Comparação do componente inflamatório entre os 2 grupos



A

B

Figura 10 – Padrão imunológico das micobacterioses pulmonares do grupo I avaliados através de reações imunohistoquímicas. A) marcação intensa para CD4; B) marcação intensa para CD8; C) marcação esparsa para CD 68; D) marcação focal para CD20; E) marcação focal para CD15 (Imunohistoquímica, 400x).

C

D

E

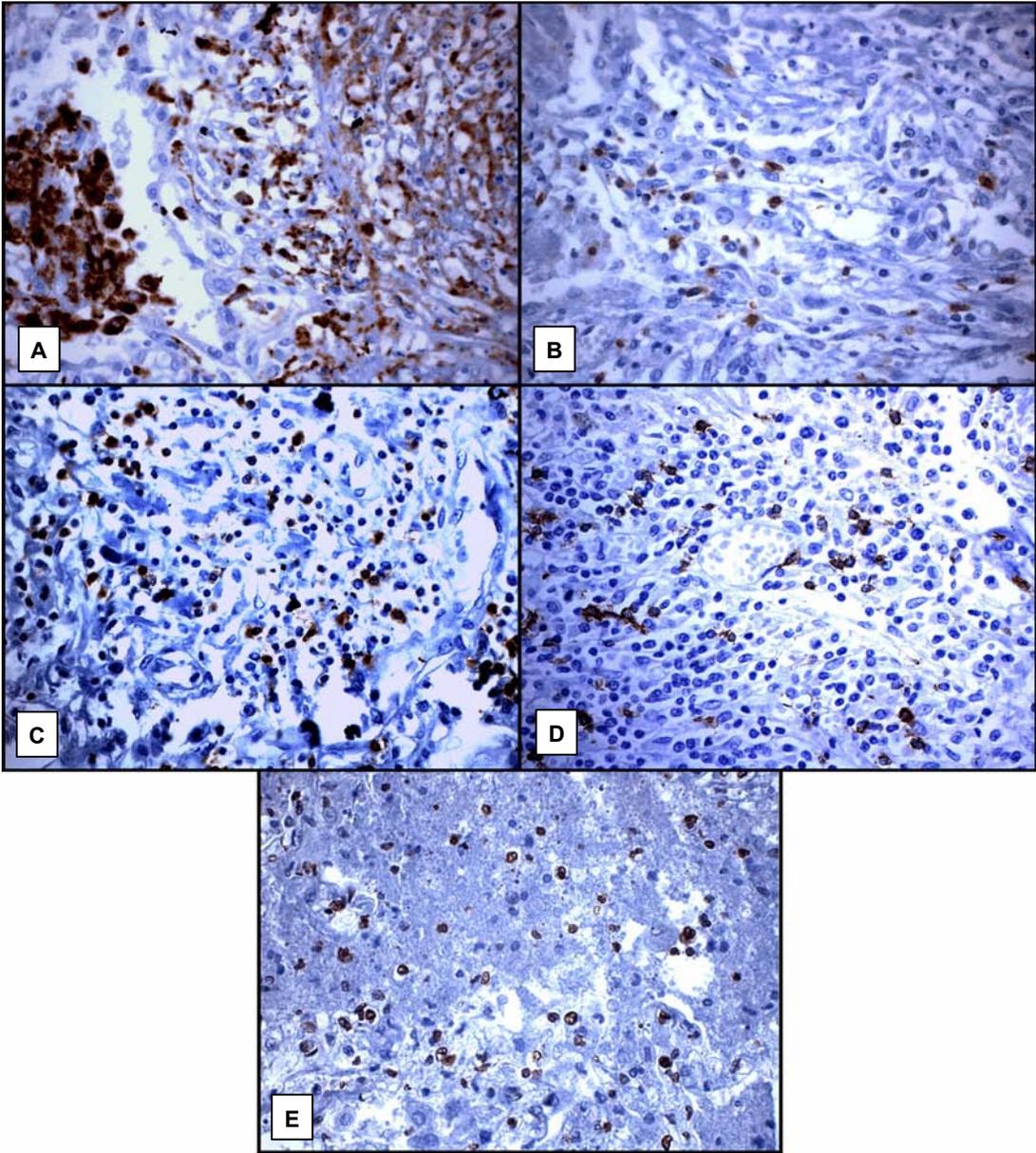


Figura 11 – Padrão imunológico das micobacterioses pulmonares do grupo II avaliados através de reações imunohistoquímicas. A) marcação intensa e difusa para CD68; B) marcação esparsa para CD8; C) marcação esparsa para CD 4; D) marcação focal para CD20; E) marcação focal para CD15 (Imunohistoquímica, 400x).

5.3. Reação em Cadeia da Polimerase

Vinte casos foram selecionados para os ensaios de PCR, sendo 10 casos pertencentes ao grupo I e 10 casos ao grupo II (Tabela 02).

Tabela 02 – Casos selecionados para Ensaios de PCR

Grupo I	Grupo II
I) N75/149 (caso 01)	I) HC87/1397 (caso 05)
II) N77/231 (caso 02)	II) HC87/1649 (caso 06)
III) N77/1019 (caso 03)	III) HC91/115 (caso 12)
IV) N80/1064 (caso 04)	IV) HC94/285 (caso 24)
V) N83/087 (caso 05)	V) HC98/221 (caso 34)
VI) N83/121 (caso 06)	VI) HC01/739 (caso 45)
VII) N83/1488 (caso 08)	VII) HC01/804 (caso 47)
VIII) N84/824 (caso 09)	VIII) HC02/122 (caso 50)
IX) HC88/673 (caso 12)	IX) HC03/865 (caso 54)
X) HC88/886 (caso 13)	X) HC04/458 (caso 58)

O primeiro ensaio de PCR (PCR Nested) possibilitou a amplificação de pequena região de gene responsável pela codificação de proteína antigênica de 65 KDa (Proteína de choque térmico) que é conservada entre as espécies de *Mycobacterium spp.* Os primers internos amplificaram um fragmento de 142pb. Esse ensaio de PCR confirmou a presença do gênero *Mycobacterium* em material parafinado em apenas 4 casos do grupo I (casos IV, VIII, IX e X) (Fig. 12). Com relação ao grupo II, 07 casos foram positivos para esse ensaio de PCR (casos III, V, VI, VII, VIII, IX e X) (Fig.13).

O segundo ensaio de PCR (PCR Nested) permitiu a amplificação de segmento de seqüência de inserção IS6110, que possibilitou a identificação de espécies do “complexo *M. tuberculosis*” em material parafinado. Os primers internos amplificaram um fragmento de 123pb. No grupo I, 8 casos (casos II, III, IV, VI, VII, VIII, IX e X), mostraram positivities (Fig.14). Já no grupo II esse ensaio foi positivo em 08 casos (casos I, II, III, IV, V, VI, VII e X) (Fig. 15).

O terceiro ensaio de PCR permitiu a identificação da espécie *Mycobacterium avium* através da identificação e amplificação de um segmento de 106pb da IS1245 por PCR simples em material fixado em formol e embocado em parafina. A infecção foi observada em apenas 01 caso do grupo II (caso VII) (Fig.

16) que também estava infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Todos os casos do grupo I foram negativos para esse ensaio de PCR.

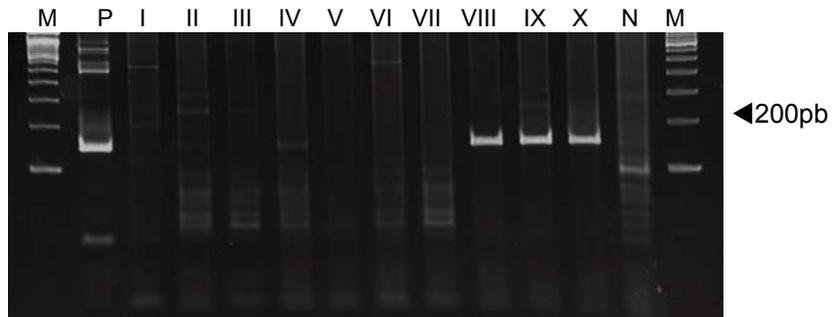


Figura 12 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pelo Brometo de Etídeo, para visualização da reação de Nested PCR dos 10 casos de micobacterioses de grupo I, para amplificação de proteína antigênica de 65 KDa (Proteína do choque térmico) conservada entre as espécies de *Mycobacterium* (142-pb). Amostras de I a X, P controle positivo, N controle negativo, M marcador de peso molecular (100-pb). Casos IV, VIII, IX e X foram positivos.

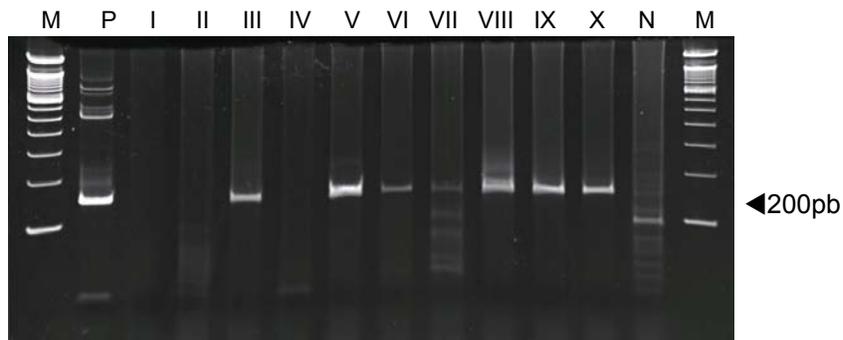


Figura 13 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pelo Brometo de Etídeo, para visualização da reação de Nested PCR dos 10 casos de micobacterioses de grupo II, para amplificação de proteína antigênica de 65 KDa (Proteína do choque térmico) conservada entre as espécies de *Mycobacterium* (142-pb).

Amostras de I a X, P controle positivo, N controle negativo - CEC, M marcador de peso molecular (100-pb). Casos III, V, VI, VII, VIII, IX e X foram positivos.

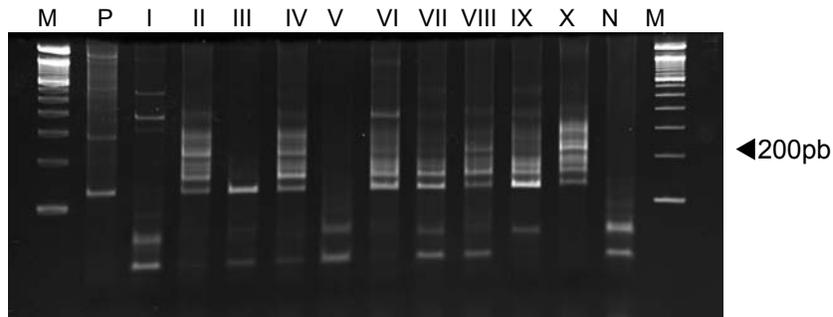


Figura 14 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pelo Brometo de Etídeo, para visualização da reação de Nested PCR dos 10 casos de micobacterioses de grupo I, para amplificação da IS6110 presentes em grande quantidade entre espécie de *Mycobacterium tuberculosis* (123-pb). Amostras de I a X, P controle positivo, N controle negativo - CEC, M marcador de peso molecular (100-pb). Casos II, III, IV, VI, VII, VIII, IX e X foram positivos.

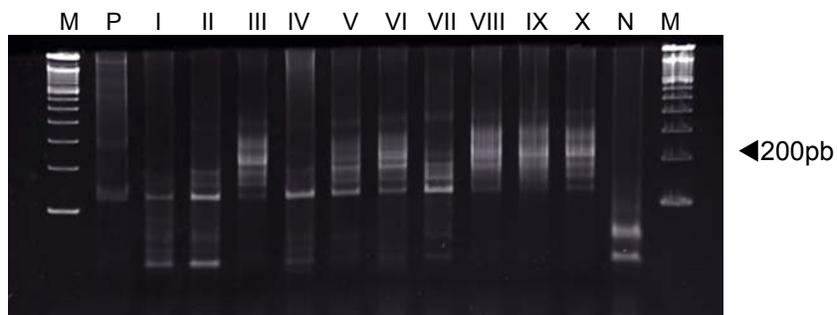


Figura 15 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pelo Brometo de Etídeo, para visualização da reação de Nested PCR dos 10 casos de micobacterioses de grupo II, para amplificação da IS6110 presente em grandes quantidades entre a espécie de *Mycobacterium tuberculosis* (123-pb). Amostras de I a X, P controle positivo, N controle negativo - CEC, M marcador de peso molecular (100-pb). Casos I, II, III, IV, V, VI, VII e X foram positivos.

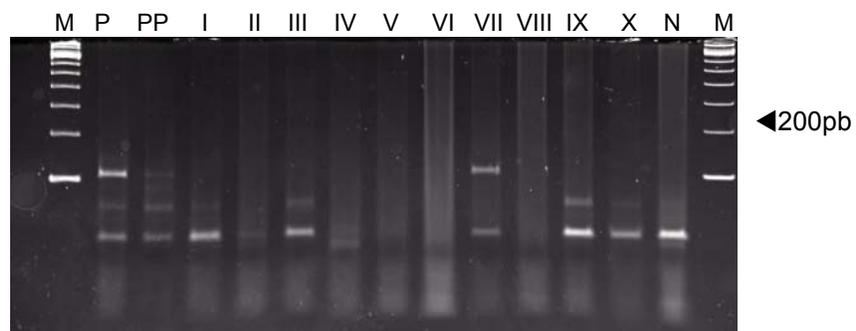


Figura 16 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pelo Brometo de Etídeo, para visualização da reação de PCR dos 10 casos de micobacterioses de grupo II, para amplificação da IS1245 (106-pb) presentes no genoma do *M. avium*. Amostras de I a X, P controle positivo – Amostra padrão IWGMT49, PP Controle positivo de material parafinado-bloco Embrapa, N controle negativo - CEC, M marcador de peso molecular (100-pb). Caso VII foi positivo.

A tabela 03 resume os dados encontrados nos casos de MBP no grupo I, quanto à coloração de ZN, imunohistoquímica para BCG e PCR. Oito casos foram positivos na coloração de ZN, 10 casos foram positivos para imunohistoquímica (BCG), 4 casos foram positivos para o gênero *Mycobacterium ssp*, 8 casos mostraram positividade para a espécie *M. tuberculosis* e nenhum caso foi positivo para a espécie *M. avium*.

Tabela 03 - Dados dos 10 casos selecionados pra PCR do grupo I

Caso	ZN*	BCG**	PCR1#	PCR2##	PCR3 ###
I) N75/149	-	+	-	-	-
II) N77/231	+	+	-	+	-
III) N77/1019	+	+	-	+	-
IV) N80/1064	+	+	+	+	-
V) N83/087	+	+	-	-	-
VI) N83/121	+	+	-	+	-
VII) N83/1488	+	+	-	+	-
VIII) N84/824	+	+	+	+	-
IX) HC87/607	-	+	+	+	-
X) HC88/886	+	+	+	+	-

*ZN – Ziehl-Neelsen; ** BCG – Bacilo Calmetto-Guerin; #PCR 1 – ensaio para Gênero *M. tuberculosis*; ## PCR 2 – ensaio para espécies *M. tuberculosis*; ### PCR 3 – ensaio para espécie *M. avium*.

A tabela 04 resume os dados encontrados nos casos de MBP no grupo II, quanto à coloração de ZN, imunohistoquímica para BCG e PCR. Seis casos foram positivos na coloração de ZN, 10 casos foram positivos para imunohistoquímica (BCG), 6 casos foram positivos para o gênero *Mycobacterium ssp*, 7 casos mostraram positividade para a espécie *M. tuberculosis* e um caso foi positivo para a espécie *M. avium*.

Tabela 04- Dados dos 10 casos selecionados pra PCR do grupo II.

Caso	ZN*	BCG**	PCR1#	PCR2##	PCR3 ###
I) HC87/1397	-	+	-	+	-
II) HC87/1649	-	+	-	+	-
III) HC91/115	+	+	+	+	-
IV) HC94/285	-	+	-	+	-
V) HC98/221	+	+	+	+	-
VI) HC01/739	+	+	+	+	-
VII) HC01/804	+	+	+	+	+
VIII) HC02/122	+	+	+	-	-
IX) HC03/865	-	+	+	-	-
X) HC04/458	+	+	+	+	-

*ZN – Ziehl-Neelsen; **BCG – Bacilo Calmette-Guerin; # PCR 1 – ensaio para Gênero *M. tuberculosis*; ## PCR 2 – ensaio para espécies *M. tuberculosis*; ### PCR 3 – ensaio para espécie *M. avium*.

6. DISCUSSÃO

A TB é a doença mais comum associada ao HIV (Toossi *et al.* 2001). A média de idade dos pacientes do grupo I foi de 28,52 anos \pm 18,21 anos, 11 eram do gênero masculino e 05 do gênero feminino. Nesse grupo a TB acometeu uma ampla faixa etária, sendo que a idade variou de 01 aos 63 anos. No grupo II (TB/AIDS) a média de idade foi de 36,2 anos \pm 10,36 anos. 44 pacientes pertenceram ao gênero masculino e 15 ao gênero feminino. Song *et al.* (2003) relataram uma faixa etária entre 20 a 39 anos em pacientes com comorbidade TB/AIDS, os quais são similares aos nossos achados.

Em nosso estudo as principais causa *mortis* para o grupo I foram TB pulmonar (n=7), Insuficiência respiratória (n=3) e Choque séptico (n=3). Já no grupo II as principais causa *mortis* foram: Septicemia (n=11), TB miliar (n=11), AIDS (n=10), Insuficiência respiratória (n=8), Broncopneumonia (n=4), e Choque séptico (n=4). Isto demonstra que as principais causas de óbitos estiveram relacionadas com TB e/ou AIDS nos dois grupos estudados.

Histopatologicamente, todos os casos acometeram o parênquima pulmonar; 15 casos do grupo I apresentaram um padrão de granuloma bem formado. O padrão histopatológico da TB reflete a imunidade celular dos pacientes. Pacientes com imunidade celular intacta possuem resposta granulomatosa típica com poucos bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998). Caso ocorra uma diminuição do número de linfócitos TCD4 ocorre uma diminuição da imunidade celular, diminuindo a formação de células gigantes tipo Langhans e células epitelióides. No estágio hiporeativo a necrose caseosa central possui inúmeros bacilos, tanto na área de necrose quanto nos macrófagos, sendo detectados pela coloração de ZN. No estágio final da AIDS, há uma resposta histiocítica com inúmeros bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998). Provavelmente devido os nossos pacientes do grupo II possuírem AIDS em estágio avançado, a maioria deles apresentou um padrão de granuloma mal formado com extensas áreas de necrose e inúmeros bacilos. Além

disso, nesse grupo encontramos as células gigantes tipo Langhans em apenas 6 casos (10,16%).

Analisando as reações imunohistoquímicas usadas para detectar as células inflamatórias presentes nos casos do grupo I, observamos que os linfócitos TCD4 foram os mais prevalentes, seguidos pelos linfócitos TCD8 e macrófagos, além de marcação focal pra CD20 e CD15. Sabe-se que o principal efetor da resposta imunológica mediada por células contra as micobactérias é o linfócito TCD4, cuja principal ação é ampliar a resposta imune do hospedeiro, ativando macrófagos e recrutando células para o local da lesão, através da liberação de citocinas (Schulger & Rom 1998). Podemos então interpretar que os linfócitos TCD4 que permeiam os granulomas, como as células que determinam a formação dos granulomas bem formados, através da secreção principalmente de citocinas Th1. Nesses indivíduos os macrófagos e células interdigitantes seriam capazes através da fagocitose, de processar os antígenos e apresentá-los aos linfócitos T recrutados para o local, estimulariam a transformação dos macrófagos teciduais em células epitelióides, conferindo o aspecto de granulomas bem formados que então seriam eficazes na contenção ou resolução do processo inflamatório. Este padrão ocorreu no grupo I, com exceção do caso 12 que apresentou depleção linfocitária por doença auto-imunenão houve depleção acentuada de linfócitos TCD4, o que permitiu a modulação dos granulomas bem formados.

Já para o grupo II (TB/AIDS) verificamos uma maior prevalência de macrófagos (CD68) seguido por linfócitos TCD8, TCD4 e áreas focais de linfócitos B (CD20) e neutrófilos (CD15). O maior número de macrófagos nesse grupo deve-se provavelmente a maior permanência desses nas lesões uma vez que possuem menor capacidade de destruir os bacilos, permanecendo repletos dos mesmos até serem destruídos pela resposta citotóxica de hipersensibilidade. A sub-população de linfócitos TCD8 através de sua ação citotóxica antígeno específica (Dannenberg 1993) seria o principal responsável pela resposta de hipersensibilidade retardada em situações de comprometimento imune. Repetidos episódios de hipersensibilidade retardada observados nos granulomas mal

formados poderiam ser responsáveis pelos aspectos de extensa necrose caseosa rica em debris celulares. Rangel *et al.* 2005 em um estudo de MB parotídea em pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada observaram através de reações imunohistoquímicas para o componente inflamatório um predomínio de linfócitos T CD8, seguido por macrófagos (CD68), linfócitos B (CD20) e T CD4. Outro trabalho utilizando esses anticorpos mostrou positividade de 81,8% e 62,5% para os anticorpos CD4 e CD 68 respectivamente em 7 espécimes de pulmão e 33 espécimes extrapulmonares com lesões granulomatosas negativas para coloração de ZN (Ardelanu *et al.* 1999).

O diagnóstico de MB é muitas vezes difícil de ser realizado. A coloração de ZN é uma técnica de reação álcool-ácido resistente e pelo alto conteúdo lipídico da parede celular das micobactérias, possui capacidade de fixar o corante fucsina de tal modo que não sofra descoloração pelo álcool-ácido. Essa coloração aliada as características de forma e tamanho é extremamente útil na detecção de infecções micobacterianas e no controle e tratamento de doenças provocadas por essas bactérias. Também é de grande valia, em função de sua fácil execução, baixo custo e especificidade, além do que um único bacilo já é indicativo de positividade. Entretanto, foi estimado que em amostras de escarros são necessários cerca de 10.000 (10^4) bacilos por mililitro de escarro para que sejam detectados microscopicamente (Harris & Maher 1996), o que em contrapartida o torna um exame de baixa sensibilidade. Além disso, outras variáveis como a forma de coleta do material e forma de processamento podem diminuir a eficácia deste método diagnóstico. Pacientes com doença grave eliminam grande número de micobactérias, apresentando boa correlação entre esfregaços positivo e cultivo microbiológico positivo. Muitos pacientes apresentam doença leve e menos avançada e a correlação entre esfregaço e cultivos positivos nesse grupo pode ser de 25 a 40% apenas. Entretanto, mesmo após a pesquisa de BAAR, esses pacientes podem continuar apresentando resultados negativos, mas com evidências clínicas da doença (Koneman *et al.* 2001). No nosso estudo a positividade para BAAR foi 82,35% e 84,75% para os grupos I e II,

respectivamente. Poucos trabalhos avaliam a sensibilidade das colorações específicas para BAAR em diferentes tecidos. Carabias *et al.* (1998) demonstraram sensibilidade de 15% em uma amostra de 65 casos de diferentes órgãos com lesão granulomatosa e argumentaram que a baixa sensibilidade seria possivelmente devido ao tratamento antibioticoterapico específico prévio que levaria a fragmentação dos bacilos. Radhakrishnan *et al* 1991 e Hove *et al.* 1998 associaram a baixa sensibilidade do método com a boa resposta imunológica celular, que ativaria adequadamente os macrófagos capacitando-os a destruir os bacilos. A grande positividade evidenciada nos dois grupos do nosso estudo aponta a importância de se iniciar a avaliação diagnóstica de processos granulomatosos tecidual através de colorações específicas e que a seguir poderá ser complementada por outras metodologias mais sensíveis e específicas. Em nosso estudo, evidenciamos maior quantidade de BAAR nos casos do grupo II .

Embora o diagnóstico inicial das micobacterioses seja baseado em evidências clínicas, o diagnóstico definitivo envolve o isolamento e a identificação em laboratório do microrganismo causador, o que pode ser difícil (Koneman *et al.* 2001). O procedimento laboratorial consiste na descontaminação, digestão do espécime, pesquisa microscópica de bacilos álcool-ácidos resistentes (coloração de ZN), isolamento do microrganismo em cultura, identificação e teste de sensibilidade às drogas do agente infeccioso. O padrão ouro para o diagnóstico de TB é a cultura microbiológica. Entretanto, a velocidade de crescimento de algumas espécies de micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis* é extremamente lenta e requer a incubação por volta de 3 a 8 semanas em meio sólido, levando, portanto a algumas semanas para obtenção dos resultados. A cultura apesar de sensível (detecta de 10 a 100 microrganismos por amostra) requer microrganismos viáveis podendo falhar em pacientes que já estejam sob tratamento anti-TB (Harries & Maher 1996). No nosso trabalho em 62 casos foram feitos exames de culturas, sendo positivos em 57 casos, no entanto a espécie de micobactérias não foram tipificadas. Em estudo realizado por Nagesh *et al.* em 2001 mostrou que cerca de 85% dos casos de TB confirmados pelo Centro de

Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, são positivos para cultura. Entretanto, na cultura a pode haver contaminação laboratorial gerando resultados falso-positivos. Por conseguinte, esses fatos resultam na necessidade da realização de outros exames, testes ou técnicas, mais sensíveis e mais rápidas que possam contribuir para o diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes, uma vez que a detecção do agente etiológico e o tratamento eficaz são a chave do sucesso no controle das doenças micobacterianas.

O segundo método diagnóstico utilizado em nosso estudo foi a pesquisa imunohistoquímica para antígenos de micobactérias em tecidos pulmonares. Todos os casos de ambos os grupos mostraram marcação positiva para o anticorpo BCG, constatando-se como já descrito na literatura, que a reação de imunohistoquímica amplia a possibilidade de diagnóstico histológico de micobacterioses. O fato da imunohistoquímica para BCG ter sido positiva em todos os casos, justifica plenamente o seu uso rotineiro nos casos em que a coloração de ZN for negativa para o diagnóstico de micobacteriose pulmonar em material fixado em formol e emblocado em parafina.

Radhakrishnan *et al.* (1991) e Hove *et al.* (1998) estudaram lesões granulomatosas no SNC e em órgãos variados com suspeitas de TB, cuja coloração específica foi negativa na identificação de BAAR. Ambos mostraram positividade na imunohistoquímica para antígenos de micobactérias em 100% e 14,3%. Os autores avaliaram que o aumento da sensibilidade do método imunohistoquímico deveu-se à capacidade de detecção de antígenos de bacilos fragmentados em meio à necrose e de material antigênico dentro do citoplasma de macrófagos e de células gigantes.

Nos últimos 10 anos, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção direta, identificação e testes de susceptibilidade das micobactérias às drogas. Esses métodos podem reduzir potencialmente o tempo do diagnóstico de semanas a dias, embora haja necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal técnico altamente qualificado. A aplicação de técnicas moleculares para a

identificação e diferenciação de isolados bacterianos tem-se revelado uma ferramenta poderosa da microbiologia auxiliando decisivamente as investigações epidemiológicas (Maslow *et al.* 1993). O outro método diagnóstico que utilizamos nesse estudo foi a PCR, realizada em 20 casos. Para a detecção do gênero *M. tuberculosis* encontramos positividade em apenas 4 casos do grupo I e em 6 casos do grupo II. Acreditamos que a pouca positividade se deve principalmente a fixação do material, uma vez que o tipo e o tempo de fixação causam efeitos importantes na amplificação da PCR (Salian *et al.* 1998).

Atualmente a técnica de PCR está bem desenvolvida e vem sendo extensivamente utilizada para o diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas (Nagesh *et al.* 2001). Além da alta especificidade, a sensibilidade da técnica é alta e particularmente útil em casos de monitoramento do tratamento, ou em casos onde outros métodos falharam na detecção do bacilo (Salian *et al.* 1998). Rivera *et al.* (2003) detectaram um caso de TB oral primária no qual o diagnóstico só foi possível mediante a utilização da PCR, pois a coloração de ZN e Auramina-Rodamina foi negativa.

O desenvolvimento e a padronização de técnicas para identificação molecular de patógenos micobacterianos em material parafinado é de grande utilidade, principalmente nos casos em que a princípio não foram suspeitos ou onde a coleta de material para cultura não tenha sido realizada. Além disso, a PCR não está restrita à presença de microrganismos viáveis, permitindo o diagnóstico retrospectivo de TB em material parafinado. Apesar das dificuldades encontradas para a amplificação, devido às alterações físico-químicas causadas pela fixação pelo formol, a PCR permitiu, além da identificação dos 4 casos do grupo I e dos 6 casos do grupo II para o gênero *Mycobacterium*, permitiu também fazer a identificação do “complexo *M. tuberculosis*” em 8 casos do grupo I e em 8 casos do grupo II. Alguns trabalhos mostram a utilização da PCR em material parafinado tanto com a utilização da IS6110 (Hsiao *et al.* 2003; Marchetti *et al.* 1998; Salian *et al.* 1998; Vago *et al.* 1998,) para a identificação do “complexo *M. tuberculosis*” como da IS1245 para o *M. avium* (Ferreira *et al.* 2002) com

resultados satisfatórios. No nosso trabalho identificamos apenas 01 caso de infecção pelo *M. avium*. Através da PCR é possível identificar as espécies de micobacterias presentes nos tecidos isoladamente ou simultaneamente. O *M. tuberculosis* é o principal causador de infecções humanas (Kim *et al.* 2001) e o *M. avium* é a espécie mais freqüente em pacientes com AIDS, em uma porcentagem de 87 a 98% dos casos isolados (Inderlied 1993, Davallos & Rastogi 1997). Dos 20 casos analisados pela PCR, não conseguimos identificar as espécies em 05 casos. Atribuimos esse fato, principalmente nos casos do grupo II a infecção por outras espécies não-tuberculosas que podem acometer pacientes com imunodeficiência, embora não possa ser excluída a possibilidade de resultado falso-negativo. Especialmente no caso V do grupo I, no qual a concentração de DNA foi extremamente baixa e deste modo foi necessário um volume de DNA muito grande, o que pode ter gerado um resultado falso-negativo em função de possíveis inibidores presentes no DNA. Diferentemente, da literatura encontramos pouca presença de *M. avium* nas MBP de pacientes com AIDS, sendo a espécie *M. tuberculosis* mais freqüente em ambos os grupos, no entanto, não podemos confirmar a virulência e o polimorfismo destas espécies de *M. tuberculosis* entre os dois grupos.

A fixação pode interferir na amplificação da PCR. Alguns inibidores endógenos podem ser induzidos pela fixação ou por outras etapas do processamento do tecido. Uma forma de reduzir estes inibidores seria a diminuição dos inibidores de DNA. Por outro lado, reduzindo a concentração do DNA há a possibilidade de diminuir a sensibilidade da PCR, especialmente nos casos paucibacilares, e facilitar a formação de “primers-dimers” (Coates *et al.* 1991, Marchetti *et al.* 1998). Marchetti *et al.* 1998 avaliaram diferentes ensaios de PCR, com diferentes concentrações de DNA. Eles encontraram piores resultados em termos de sensibilidade quando realizou-se PCR com 5µg em comparação com 1µg e com 3µg. O protocolo utilizado para os ensaios de PCR nesse estudo foi baseado nos protocolos desses autores e realizamos a amplificação com a concentração de 3µg em todos os ensaios de PCR exceto no segundo ensaio

(identificação do “complexo *M. tuberculosis*”), no qual utilizamos 2µg. Os autores citados acima encontraram um grande número de falso-negativos com 5µg, o que provavelmente esteja relacionado a uma grande quantidade de inibidores. Outro fator importante na amplificação de material parafinado é o tamanho do produto a ser amplificado, em função da alta degradação dentro da cadeia polipeptídica em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina. No genoma do *M. tuberculosis* isso é particularmente verdadeiro em função da alta taxa de guaninas e citosinas, uma vez que o formol possui a capacidade de se ligar aos grupos amino-terminais presentes nesses nucleotídeos (Marchetti *et al.* 1998). Esses autores encontraram melhores resultados com “primers” menores de 106 e 123 pb, sugerindo que uma correta escolha dos primers, que amplificam seqüências de DNA relativamente pequenas com menor chance de fragmentação, pode favorecer a amplificação e aumentar a sensibilidade da técnica. Além disso, o número de cópias do fragmento-alvo dos “primers” está relacionado à eficácia da amplificação. A IS6110 está geralmente presente em múltiplas cópias no genoma de todos os membros do “complexo *M. tuberculosis*” (Roth *et al.* 1997) e a IS1245 apresenta uma média de 20 cópias (Guerrero *et al.* 1995), oferecendo um alto poder descritivo. Ardelanu *et al.* (1999) analisaram através de PCR 7 casos de espécimes pulmonares e 33 espécimes não pulmonares de lesões granulomatosas e obtiveram positividade para a IS6110 em 77,5% dos casos.

Em resumo, nossos resultados mostraram que com o advento da AIDS houve uma mudança no perfil imunológico das micobacterioses pulmonares devido à depleção linfocitária. A técnica de imunohistoquímica para o anticorpo BCG pode ser útil para identificação do bacilo quando a coloração de ZN foi negativa. A amplificação e identificação molecular de espécies de *Mycobacterium* a partir de material parafinado é possível e pode auxiliar no estudo retrospectivo de micobacterioses de forma rápida e eficaz abrindo perspectivas animadoras para sua aplicação clínica no diagnóstico de casos de micobacterioses nos laboratórios de patologia.

7. CONCLUSÕES

1- Histopatologicamente observamos que no grupo I houve um forte predomínio de granulomas bem formados e no grupo II (TB/AIDS) devido à depleção linfocitária ocorreu predomínio de granulomas mal formados.

2- A resposta inflamatória crônica granulomatosa vista na micobacteriose pulmonar não associada a AIDS caracterizou-se predominantemente por linfócitos TCD4 e TCD8, enquanto que no grupo micobacteriose/AIDS o predomínio foi de macrófagos seguidos por linfócitos TCD8.

3- A técnica de imunohistoquímica para o anticorpo BCG pode ser útil para identificação do bacilo quando a coloração de ZN for negativa, visto que a imunohistoquímica foi mais sensível que a técnica de ZN e de PCR em ambos os grupos.

4- As micobacterioses pulmonares antes e durante a AIDS são causadas principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*.

5- A técnica de PCR apresentou uma sensibilidade de 80% no grupo I e 70% no grupo II para identificar cepas de *M. tuberculosis* em micobacterioses pulmonares emblocadas em parafina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DO. The granulomatous inflammatory response: a review. **Am J Pathol** 1976; 84 (1): 164-183.

Afessa B, Green W, Chial J, Frederick W. Pulmonary complications of HIV Infection: Autopsy Findings. **Chest** 1998; 113 (5): 1225-1229.

Ardelanu C, Andrei F, Ceausu M, Ene D, Mihai M, Butur G. Cellular immune response in atypical tuberculosis diagnosed by PCR in paraffin embedded material. **Rom J Morphol Embryol** 1999-2004; 45: 63-72.

Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Brasília, Ministério da Saúde. 2004; ano I; número 1. p. 5-12.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis** 2003; 83 (1): 98-106.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da Tuberculose**. 2ª ed., Rio de Janeiro, 1994, 115p.

Brasil. Ministério da Saúde. **DST-AIDS 2005**. Disponível em www.aids.gov.br/data/PagerLUMISD3352823PTBRIE.htm [2006Fev 2].

Carabias E, Palenque E, Serrano R, Aguado JM, Ballestín C. Evaluation of an immunohistochemical test with polyclonal raised against mycobacteria used in formalin-fixed tissue compared with mycobacterial specific culture. **APMIS** 1998; 106 (3): 385-388.

Cayabyab M, Rohne D, Pollakis G, Messele T. Rapid CD4+ T-lymphocyte depletion in rhesus monkeys infected with a simian-human immunodeficiency virus expressing the envelope glycoproteins of a primary dual-tropic ethiopian clade c HIV type 1 isolate. **AIDS Res Hum Retroviruses** 2004; 20(1): 27-40.

Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, Moore RD. Impact of opportunistic disease on survival in patient with HIV infection. **AIDS** 1999; 12 (1): 29-33.

Chaisson RE, Moore RD, Richman DD, Deruly T. The zidovudine epidemiology study group. Incidence in patients with advanced human immunodeficiency virus disease with zidovudine. **Am Rev Respir Dis** 1992; 146 (2): 285-289.

Clereci M, Shearer GM. A TH1 – TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. **Immunol Today** 1993; 14(3): 107-111.

Clereci M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via Cs, *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. **J Clin Invest** 1989; 84(6) 1892-1899.

Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, kangro HO, Slavin G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. **J Clin Pathol** 1991; 44 (2): 115-118.

Cotran RS, kumar V, Collins T. Doenças da imunidade. Em: Cotran RS, kumar V, Collins T. **Patologia estrutural e funcional** 7a ed. Guanabara Koogan 2004. p. 245-258.

Cruciani M, Malena M, Bosco O, Gatti G, Serpelloni G. The impact of Human Immunodeficiency Virus type 1 on Infectiousness of Tuberculosis: a Meta analysis. **Clinical Infectious Diseases** 2001; 33 (11): 1922-1930.

Crump JA, Reller B. Two decades of Disseminated Tuberculosis at University Medical Center: The Expanding Role of Mycobacterial Blood Culture. **Clin Infect Dis** 2003; 37 (8): 1037-1043.

Damsker B, Bottone EJ. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. **J Infec Dis** 1985; 151 (1): 179-181.

Dannenberg JR. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hosp Pract** 1993; 28 (1): 51-58.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T

cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J Immunol** 1993; 150 (2): 353-360.

Devollois A, Rastogi N. Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting. **Res Microbiol** 1997; 148 (8): 703-713.

Ferreira RM, Saad MH, Silva MG, Fonseca L de S. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital AIDS Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(5): 725-729.

Fiallo P, Williams DL, Chan GP, Gillis TP. Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol** 1992; 30: 3095-3098.

Field SK, Fisher D, Cowie RL. *Mycobacterium avium* complex Pulmonary disease in patients without HIV. **CHEST** 2004; 126 (2): 566-581.

Franzetti F, Gori A, Vezzoli S, Rossi C, Esposti D, Bandera A *et al*. Epidemiology of *Mycobacterium avium* infection in north Italy. **AIDS** 1997; 11 (8): 1065-1066.

French AL, Benator DA, Gordin FM. Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Medical Clinics of North America** 1997; 81(2): 361-375.

Frothingham R, Wilson KH. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. **J Bacteriol** 1993; 175 (10): 2182-2185.

Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary Tuberculosis: An Overview. **Am Fam Physician** 2005; 72(9): 1761-1768.

Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ *et al*. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. **Science** 1994; 265 (5169): 248-252.

Greer CE, Peterson SL, Kiviati NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. **Am J Clin Pathol** 1991; 95 (2): 117-124.

Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T, Telenti A. A novel Insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **J Clin Microbiol** 1995; 33 (2): 304-307

Harries AD, Maher D. **TB/HIV A clinical manual** 1996, disponível em: URL: http://www.who.int/gtb/publications/tb_hiv/ [2004 Abr 23].

Havir DV, Ellner JJ. *Mycobacterium avium* complex. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5th ed. New York, Churchill Livingstone; 2000. p. 2630-2635.

HIV/AIDS Tuberculosis and Malaria. Disponível em: http://www.unaids.org/bangkok2004/GAR2004_html/ExecSummary_en/Execsumm_en.pdf [2005 Nov 11].

Holt Jg, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willins ST In: **Bergey's manual of Determinative Bacteriology**. 5th ed. U.S.A. Williams & Wilkins; 1994. p. 597-603

Hove MGM, Smith MB, Hightower B, Pencil SD. Detection of mycobacteria with use of immunohistochemical in granulomatous lesions staining negative with routine acid-fast stains. **Appl Immunohistochem** 1998; 6(3): 169-172.

Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, Yi Su H. Polymerase chain reaction based of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissue showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. **Int J Dermat** 2003; 42 (4): 281-286.

Humphrey DM, Weiner MH. Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in pulmonary tuberculosis. **Hum Pathol** 1987; 18 (7): 701-708.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **J Histochem Cytochem** 1981; 29 (4): 577-580.

Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 142 (3): 710-716.

Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez EM. The *Mycobacterium avium* complex. **Clin Microbiol Rev** 1993; 6 (3): 266-310.

Jacobson MA, Hopewell PC, Yajko DM, Hadley WK, Lazarus E, Mohanty PK *et al.* Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **J Infect Dis** 1991; 164 (5): 994-998.

Klatt E. **Pathology of AIDS.** Disponível em www-medib.med.utah.edu/webPath/AIDS 2004 [2004 Abr 29].

Klautau GB, Kuschnaroff TM. Clinical forms and outcome of tuberculosis in HIV infected patients in a tertiary Hospital in São Paulo – Brazil. **Braz J Infec Dis** 2005; 9 (6): 464-478.

Kim Bj, Lee KH, Partk BN, Bai GH, Kim SJ *et al.* Differentiation of *Mycobacterium* Species by PCR-Restriction. Analysis of DNA (342 Base pairs) of the RNA Polymerase gene (*rpo*). **J Clin Microbiol** 2001; 39(6): 2102-2109.

Konemam EW, Allen Sd, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido** 5^a. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

Leão SC, Briones MRS, Sircilli MP, Balian SC, Mores N, Ferreira-Neto JSF. Identification of two novel *Mycobacterium avium* Allelic variants in Pig and Human isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. **J Clin Microbiol** 1999; 37(8): 2592-2597.

Lewin-Smith MR, Klassen MK, Frankel SS, Nelson AM. Pathology of Humans Immunodeficiency Virus Infection: Infections Conditions. **An Diag Pathol** 1998; 2(3): 181-194.

Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. **Microbiol Mol Biol Rev** 1999; 63 (3): 507-522.

McAdam RA, Quan S, Guilhot C. Mycobacterial transposons and their applications. *In*: Hatfull GF, Jacobs Jr WR. **Molecular genetics of mycobacteria**. Washington, 2000. p. 69-84.

Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, De Carli M, Piccinni MP *et al.* Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. **Science** 1994; 265(5169): 244-248.

- Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi Mc *et al.* Evaluation of PCR in Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Formalin-Fixed, paraffin-Embedded Tissue: Comparison of Four Amplification Assay. **J Clin Microbiol** 1998 36 (6): 1512-1517.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin Infect Dis** 1993; 17 (2): 1531-1562.
- Matee MI, Scheutz F, Moshy J. Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians. **Oral Dis** 2000; 6 (2): 106-111.
- Mayaud C, Cadranet J. Tuberculosis in AIDS; past or new problems? **Thorax** 1999; 54(7): 567-571.
- Mello FCQ. **Modelos Predictivos para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar** [tese] Rio de Janeiro. FM/UFRJ, 2001
- Melo FAF, Afiune JB. Patogenia e Imunidade. In: Veronesi R, Focaccia R. **Tratado de infectologia**. São Paulo, Atheneu 1996. p. 917-919.
- Miziara ID. Tuberculosis affecting oral cavity in Brazilian HIV-infected patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2005; 100 (2): 179-182.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definitions according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol** 1986; 136(7): 2348-2357.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS. **Medical Microbiology**. 3th ed. St. Louis, Missouri, Mosby Year Book Inc 1998. p. 719.
- Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pleural Fluid. **Chest** 2001; 119(6): 1737-1741.
- Ohara Y, Honma M, Iwasaki Y. Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue: effect of unbuffered formalin fixation. **J Virol Methods** 1992; 37 (1): 83-88.

Ohtomo K, Wang S, Masunaga A, Aikichi I, Sugawara I. Secondary infections of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection. **Tohoku J Exp Med** 2000; 192 (2): 99-109.

Oliveira RS, Sircili EMD, Balian SC, Ferreira-Neto JS, Leão SC. Identification of *Mycobacterium avium* Genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based restriction fragment length polymorphism and restriction analysis of hsp65. **J Clin Microbiol** 2003; 41 (1): 44-49.

Opravil M. Epidemiological and clinical aspect of mycobacterial infections. **Infections** 1997; 25(1): 56-59.

Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham JO. Epidemiology of infections by nontuberculosis mycobacteria: IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. **Am Rev Respir Dis** 1983; 128 (4): 652-656.

Pestel-Caron M, Arbeit RD. Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. **J Infect Dis** 1998; 36 (7): 1859-1863.

Peters M, Muller C, Rusch-Gerdes S, Seidel C, Gobel U, Pohle HD *et al.* Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infections in AIDS patients? **J Infect** 1995; 1 (1): 39-44.

Picardeau M, Vincent V. Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR. **J Clin Microbiol** 1996; 34 (2): 389-392.

Porter JD. Mycobacterioses and HIV infections: the new public health challenge. **J Antimicrob Chemother** 1996; 37: 113-120.

Radhakrishnan VV, Mathai A, Radhakrishnan NS. Immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens in intracranial tuberculoma. **Indian J Exp Biol** 1991; 29 (7): 641-644.

Rangel ALCA, Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Lucena A, Saldiva PHN, Vargas PA. Parotid mycobacteriosis is frequently caused by *Mycobacterium tuberculosis* in advanced AIDS. **J Oral Pathol Med** 2005; 34 (7): 407-412.

Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, reddy MV, Gangadharam PRJ, Bates JH. Polymerase chain reaction of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed tissue. **Am J Respir Crit Care Med** 1996; 153: 1419-1423.

Rivera H, Correa MF, Castillo-Castillo S, Nikitakis NG. Primary oral tuberculosis: a report of a case diagnosed by polymerase chain reaction. **Oral Dis** 2003 Jan; 9 (1): 46-48.

Rocken M, Saurat JH, Hauser C. A common precursor for CD4+ T cells producing IL-2 or IL-4. **J Immunol** 1992; 148 (4): 1031-1036.

Rom WN, Zhang Y. The rising tide of tuberculosis and the human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Lab Clin Med** 1993; 121 (6): 737-741.

Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspective. **Eur J Respir Dis** 1997; 10 (8): 1877-1891.

Rose DN, Vetter S, Gutman A. Diagnosis and management of tuberculosis in patients with HIV infection. **Mt Sinai J Med** 1998; 65 (1): 14-20.

Runyon EH. Pathogenic mycobacteria. **Bibl Tuberc** 1965; 21: 259-264.

Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in histologic specimens. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 158 (4): 1150-1155.

Saltini C, Ivanyi J. Bridging research to medicine. **Eur Respir J** 1995; suppl 20: 615s-616s.

Sangari FJ, Bachli M, Bermudez LE, Bodmer T. Characterization of IS666, a newly described insertion element of *Mycobacterium avium*. **Microb Comp Genomics** 2000; 5 (4): 181-188.

Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157: 679-691.

Shinnick TM, Good RC. Diagnostic Mycobacteriology Laboratory Practices. **Clin Infect Dis** 1995; 21 (2): 291-299.

Smith MB, Boyars MC, Veasey S, Woods GL. Generalized tuberculosis in the acquired immune deficiency syndrome. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124 (9): 1267-1274.

Snider DE, Roper WL. The new tuberculosis. **N Engl J Med** 1992; 326 (10): 703-705.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **J Brás Pneumol** 2004; 30 (supl 1): S1-S85.

Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry** 2001; 47 (5): 809-814.

Song ATW, Schout D, Novaes HMD, Goldbaum M. Clinical and Epidemiological features of AIDS/Tuberculosis comorbidity. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo** 2003; 58 (4): 207-214.

Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault V. Numerical taxonomy of mycobatin-dependent Mycobacteria, amended description of *Mycobacterium avium*, and description of *M. avium* subsp. *avium* subsp. nov., *M. avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *M. avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **Int Syst. Bacteriol** 1990; 40 (3): 254-260.

Toossi Z, Mayanja-Kizza H, Hirsch CS, Edmonds KL, Spahlinger T, Hom DL, Aung H, Mugenyi P, Ellner JJ, Whalen CW. Impact of tuberculosis (TB) on HIV-1 activity in dually infected patients. **Clin Exp Immunol** 2001; 123 (2): 233-238.

Vago L, Barberis M, Gori A, scarpellini P, Sala E, Nebuloni M *et al.* Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 sequence on formalin-fixed paraffin-embedded tissue with granulomatous diseases for rapid diagnosis of tuberculosis. **Am J Clin Pathol** 1998; 109 (4): 411-415.

van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, Leão SC, Pavlik I, Vincent V *et al.* IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. **J Clin Microbiol** 1998; 36 (10): 3051-3054.

Vargas PA, Mauad T, Bohm GM, Saldiva PH, Almeida OP. Parotid gland involvement in advanced AIDS. **Oral Dis** 2003; 9 (2): 55-61.

Veronesi R, Focaccia R, Lomar AV. **Retrovíroses Humanas HIV/AIDS** 1ª ed. São Paulo: Ateneu 2000.

UNAIDS. **AIDS Epidemic updat: 2004.** Disponível em:
http://www.unaids.org/epi/2005/doc/EPIupdate_2005.pdf [2006 Jan 18].

Young B, Heath JW. **Wheater Histologia Funcional – texto e atlas em cores 4^a.**
ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2002 p 222- 236.

Yssel H, De Waal Malefth R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H et
al. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood
T cell. **J Immunol** 1992; 149 (7): 2378-2384.

9. ANEXO



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22.06.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **440/05**, intitulado: "Identificação das espécies de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* em micobacterioses pulmonares no período de 1974 a 2004. Análise histopatológica, imuno-histoquímica e por PCR" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Thais Mauad**

Pesquisador (a) Executante: **Dra. Andréia Aparecida da Silva**

CAPPesq, 22 de Junho de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa