

# Perfil de citocinas e células imunológicas em pacientes com tuberculose pleural co-infectados ou não pelo HIV

*Cytokine and immune cell profile pleural tuberculosis in patients with and without HIV co-infection*

Anete Trajman,<sup>(1,2)</sup> Marcia Teresa Carreira Teixeira Belo,<sup>(1,2)</sup> Eleny Guimarães Teixeira,<sup>(1,2)</sup> Marcia P. Oliveira,<sup>(2,3)</sup> Ricardo Granato,<sup>(4)</sup> Mario Monjardim Castello Branco,<sup>(1,2)</sup> Claude Pirmez<sup>(2,3)</sup>

## RESUMO

**Introdução:** a tuberculose pleural tem uma evolução benigna, mesmo quando associada à infecção pelo HIV. Com o objetivo de compreender os mecanismos imunológicos envolvidos neste fenômeno, nós comparamos as concentrações de citocinas e subgrupos de células imunológicas no líquido e tecido pleural de pacientes com tuberculose pleural com e sem infecção pelo HIV. **Material e métodos:** foram incluídos 42 pacientes com o diagnóstico de tuberculose pleural, dos quais 12 infectados pelo HIV. A análise imunohistoquímica do tecido pleural foi realizada em 21 pacientes utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4, anti-CD8, anti-delta TCR, anti-perforina e anti-FasL. A concentração de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-) foi medida pelo método ELISA no líquido pleural de 29 pacientes. **Resultados:** a mediana das proporções de células CD8+ e perforina+ foi superior nos pacientes infectados pelo HIV. A proporção de células CD4+, FasL+ e delta-TCR+ foram semelhantes nos dois grupos. A IL-4 foi indetectável em todos os pacientes. Três de nove pacientes infectados pelo HIV apresentaram uma concentração de IL-2 superior a 40 pg/ml (p=0,02). **Conclusões:** as concentrações de IFN-, IL-10 e IL-12 foram semelhantes nos dois grupos. A citotoxicidade mediada pela perforina e a IL-2 parecem ter um papel importante na proteção contra o Mycobacterium tuberculosis nos estádios iniciais da infecção pelo HIV. As células CD8+ do tecido pleural podem ser uma fonte alternativa de síntese de IFN- em pacientes com tuberculose pleural co-infectados pelo HIV.

## ABSTRACT

**Introduction:** pleural tuberculosis (TB) has a benign course whether associated or not to HIV infection. To understand the immune mechanisms involved in this phenomenon, we compared cytokine concentrations and subsets of immune cells in the pleural fluid/tissue from patients with TB pleurisy with and without HIV co-infection. **Material and methods:** forty-two patients diagnosed with pleural TB were included, twelve of whom were HIV-infected. Immunohistochemical analysis of pleural tissue was performed in 21 patients using the following monoclonal antibodies: anti-CD4, anti-CD8, anti-delta TCR, anti-perforin and anti-FasL. Cytokine (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 and IFN-) concentration was measured by the ELISA method in the pleural fluid of 29 patients. **Results:** the median proportions of CD8+ and perforin+ cells were higher in HIV-infected patients. The proportions of CD4+, FasL+ and delta-TCR+ cells were similar in both groups. IL-4 was undetectable in all patients. Three out of nine HIV-infected patients had IL-2 concentration over 40 pg/mL (p=0.02). **Conclusion:** the concentrations of IFN-, IL-10 and IL-12 were similar in both groups. Perforin-mediated cytotoxicity and IL-2 may play an important role in protection against Mycobacterium tuberculosis in the early stages of HIV infection. Pleural CD8+ cells may be an alternative source for IFN- in HIV-infected patients with tuberculosis.

**Descritores:** citocinas, HIV, Mycobacterium tuberculosis, perforina, pleurite, linfócitos.

**Keywords:** cytokines, HIV, Mycobacterium tuberculosis, perforin, pleurisy, lymphocytes.

## Introdução

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* se apresenta de forma diversa, podendo se manifestar apenas por prova tuberculínica positiva em indivíduos saudáveis, traduzindo uma infecção latente, até por doença disseminada, eventualmente fatal. As diferentes formas de apresentação desta infecção são conseqüência do tipo de resposta imune do hospedeiro. A tuberculose pleural é um modelo clínico e imunológico de resistência natural contra a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, já que um número considerável de pacientes pode apresentar regressão espontânea do derrame pleural.<sup>(1)</sup> Uma resposta imune local, potente e efetiva foi demonstrada no pleuris tuberculoso,<sup>(2,3)</sup> sugerindo que a mesma é a responsável pela eliminação do bacilo.

Em pacientes imunocompetentes, a secreção de IFN-, TNF-, IL-10 e IL-12 está aumentada no líquido pleural quando comparada ao sangue, enquanto a IL-2, IL-4 e IL-5 são indetectáveis.<sup>(2,3)</sup> Por esta razão, a dosagem da concentração do IFN- no líquido pleural tem sido proposta como um método alternativo para o diagnóstico da tuberculose pleural.<sup>(4)</sup>

Em pacientes infectados pelo HIV, a história natural da tuberculose pleural é similar à observada em indivíduos soronegativos.<sup>(5)</sup> Entretanto, os mecanismos imunoreguladores envolvidos neste fenômeno são mal conhecidos.

Os mecanismos específicos de defesa contra o *M. tuberculosis* constituem um fenômeno complexo que envolve uma variedade de células e seus produtos. Entre estes, linfócitos citotóxicos CD8+ mediados por perforina/granzima,<sup>(6)</sup> citocinas do tipo Th1<sup>(7)</sup> e linfócitos gama-delta+<sup>(8)</sup> parecem desempenhar um papel importante. Stenger e colaboradores,<sup>(9)</sup> em elegante experimento, demonstraram que, *in vitro*, dois diferentes tipos de linfócitos citotóxicos (células CD4-CD8- e células CD4-CD8+) podem lisar macrófagos que contêm o *M. tuberculosis*. Enquanto as células CD4-CD8- utilizam a resposta Fas-FasL, a resposta citotóxica das células CD4-CD8+ é mediada por mecanismos grânulo-dependentes e resultam em morte do bacilo intracelular. Um importante componente destes grânulos citotóxicos é a perforina, que promove a lise da célula alvo através da indução da formação de poros.

Com o objetivo de contribuir para o entendimento dos mecanismos de proteção envolvidos na resposta imune de pacientes com tuberculose pleural infectados pelo HIV, nós comparamos diferentes tipos de células imunológicas no fragmento pleural e a concentração de citocinas no líquido pleural de pacientes com tuberculose pleural com e sem a co-infecção pelo HIV.

## Métodos

### Desenho do estudo e pacientes

Foi realizado um estudo transversal entre abril de 1996 e outubro de 1998, no Serviço de Clínica Médica da 7ª Enfermaria do Hospital Geral da Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, que presta atendimento secundário para a população carente do município. Todos os pacientes que obtiveram o diagnóstico final de tuberculose pleural neste período foram incluídos no estudo, que obteve aprovação do comitê de ética do Hospital.

### Diagnóstico da tuberculose

Todos os pacientes foram submetidos à toracocentese com biópsia pleural para fins de diagnóstico, após assinarem o termo de consentimento informado. O líquido pleural foi processado para análises bioquímica e citológica e para cultura em meio de Lowenstein-Jensen. Uma porção do fragmento tecidual foi fixada em formol, incluída em parafina, corada pela hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica, e pelo método de Wade para pesquisa de bacilo ácido-álcool resistente (BAAR). As lâminas foram avaliadas quanto à presença de granulomas, necrose caseosa, células gigantes multinucleadas e células epitelióides e quanto à presença de BAAR. Outra porção da biópsia foi enviada para cultura para o *M. tuberculosis*. Os pacientes com tosse produtiva também foram submetidos à bacterioscopia e cultura do escarro. De acordo com os critérios do Ministério da Saúde do Brasil,<sup>(10)</sup> o diagnóstico final foi o de tuberculose quando a bacterioscopia do líquido ou do escarro foi positiva, quando a cultura para o *M. tuberculosis* no líquido ou no escarro foi positiva ou ainda quando se evidenciaram granulomas com ou sem necrose caseosa ao exame histopatológico. De acordo com o Consenso Brasileiro de Tuberculose (1997),<sup>(11)</sup> os pacientes com febre por

(1) Departamento de Medicina, Universidade Gama Filho

(2) Fundação Técnico-Educacional Souza Marques

(3) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

(4) Hospital Geral da Santa Casa da Misericórdia, Rio de Janeiro, BRAZIL.

**Correspondência:** Anete Trajman

Rua Macedo Sobrinho 74/203 - Humaitá, Rio de Janeiro 22271-080 Brasil

Artigo recebido para publicação no dia 31/07/2002 e aceito no dia 05/11/2002, após revisão.

mais de duas semanas, que apresentavam um derrame pleural exudativo com efusão linfocitária e que responderam ao tratamento com as drogas tuberculostáticas também foram incluídos no estudo e receberam o diagnóstico de probabilidade de tuberculose pleural.

### **Sorologia anti-HIV**

Todos os pacientes foram submetidos à sorologia anti-HIV utilizando dois testes de segunda geração (ELISA, Abott e Roche). Quando positivo, um teste de imunofluorescência foi realizado para confirmar a infecção pelo HIV.

### **Imunohistoquímica**

Uma terceira porção de tecido pleural foi embebido em OCT (Tissue Tek, Miles Inc., Elkhart, USA) e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Todos os espécimes foram codificados e fixados em acetona por 20 minutos. Após secagem, as lâminas foram coradas pela técnica de imunoperoxidase por avidina-biotina (Vecstatin Elite, Vector Laboratories, Burlingame, USA), utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4, anti-CD8, anti-receptor de célula T delta (-TCR), anti-perforina e anti-FasL. As diluições e origem dos anticorpos estão discriminadas na tabela I. As lâminas foram incubadas com anticorpo monoclonal primário durante uma hora à temperatura ambiente, exceto para anti-FasL e anti-perforina, que foram incubados por uma noite a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Além disso, uma lâmina foi usada como controle negativo da reação.

As células positivas foram contadas sobre um total de 300 células por um patologista que desconhecia o status HIV dos pacientes. As células positivas foram expressas em percentagem. A relação CD4/CD8 no sítio da lesão foi calculada.

### **Medida da concentração das citocinas**

O líquido pleural foi centrifugado a 2500 rpm e o sobrenadante foi separado para medir a concentração de citocinas. Para a IL-2, IL-4 e IL-10, foi utilizado um kit ELISA quantitativo (Biotrak assays, Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK). As concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-12 foram medidas por um teste ELISA utilizando anticorpos monoclonais humanos anti-IL-12 (que reconhece a fração p40) e anti IFN- humano (Pharmigen, San Diego, CA). As amostras foram testadas em duplicata e o valor médio foi calculado. A sensibilidade dos kits era de 5 pg/ml para IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-12 e 0,1 pg/ml para IL-10.

### **Estatística**

O teste de Wilcoxon foi usado para comparar médias e o teste do qui-quadrado para comparar proporções.

## **Resultados**

Um total de 42 pacientes recebeu o diagnóstico final de tuberculose pleural no período do estudo. A idade mediana foi de 33 (13-80) anos; 28 pacientes eram da raça negra e 14 eram brancos. Apenas 5 pacientes eram mulheres, já que a maior parte dos pacientes eram provenientes de uma enfermaria masculina. A prevalência da infecção pelo HIV foi de 29%. Treze dos trinta e sete pacientes do sexo masculino estavam infectados pelo HIV, enquanto todas as pacientes do sexo feminino eram soronegativas. A tuberculose pleural foi a primeira manifestação da infecção pelo HIV em todos os pacientes.

O diagnóstico de tuberculose pleural foi baseado em critério histopatológico em 25 pacientes, em cultura positiva do líquido pleural em 7 pacientes e em critérios clínicos em 10 pacientes, dos quais 3 estavam infectados pelo HIV.

A imunohistoquímica foi realizada em espécimes pleurais de 21 pacientes, dos quais 7 eram soropositivos. Nos outros pacientes, não havia fragmento pleural bem preservado disponível. A percentagem mediana das células positivas nos dois grupos está apresentada na tabela II. A mediana da proporção das células CD8+ e perforina+ foi significativamente maior nos pacientes infectados pelo HIV. A relação CD4/CD8 foi menor no sítio de doença nos pacientes HIV+ (1,33 0,52 versus 2,08 0,95,  $p=0,007$ ). Isto se deveu principalmente ao aumento das células CD8+. A mediana da percentagem de células CD4+, FasL+ e -TCR+ foi similar nos dois grupos.

As células CD8+ estavam presentes principalmente na periferia dos granulomas, nos dois grupos. Ao contrário, as células CD4+ estavam dispersas nas lesões granulomatosas. Os grânulos de perforina estavam presentes na periferia das células positivas.

O ELISA para as citocinas foi realizado em 29 pacientes, dos quais 9 estavam infectados pelo HIV. Foram detectados níveis elevados de IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ , e as concentrações medianas foram similares nos dois grupos (tabela III). A concentração de IL-4 foi inferior ao nível de sensibilidade do método (5 pg/ml) em todos os pacientes. Apenas 3 dos 9 pacientes infectados pelo HIV, tiveram a concentração de IL-2 superior a 40 pg/ml ( $p=0,002$ ), embora não houvesse diferença entre as concentrações medianas nos dois grupos (24 pg/ml x 1 pg/ml  $p=0,25$ ).

## **Discussão**

A tuberculose ainda é um grave problema de Saúde em todo o mundo<sup>(1,2)</sup>. No Rio de Janeiro, a tuberculose pleural é a forma extra-pulmonar mais comum em

pacientes soronegativos, enquanto a adenite tuberculosa é a forma mais comumente associada à infecção pelo HIV.<sup>(13)</sup> Entretanto, a prevalência da infecção pelo HIV entre os pacientes com tuberculose pleural foi alta em outra série do mesmo serviço (30%).<sup>(5)</sup>

A imunopatogenia da tuberculose ainda não é completamente conhecida. O papel das diferentes células e citocinas foi bem estudado em camundongos com deleção de genes específicos. Camundongos deficientes em perforina, granzima e células T gama-delta+,<sup>(14)</sup> parecem ser capazes de responder eficientemente ao *M. tuberculosis*, embora as células que expressam estas moléculas também contribuam na resposta protetora.<sup>(8,9)</sup> Inversamente, camundongos que apresentam deficiência em IFN- $\gamma$ ,<sup>(7)</sup> IL-6<sup>(15)</sup> e IL-12<sup>(16)</sup> apresentam tuberculose disseminada ou letal. Embora as células CD4+ estejam predominantemente envolvidas na resposta imune protetora, células gama-delta e células citotóxicas CD8+ também parecem ter importante papel complementar. Linfócitos citotóxicos CD8+ de pulmão de camundongos infectados pelo *M. tuberculosis* expressam perforina e lisam macrófagos.<sup>(17)</sup> Em humanos, o papel dos diferentes subtipos de células

imunológicas e seus produtos é mais difícil de ser estudado. Os pacientes infectados pelo HIV representam um modelo de depressão imunológica, nos quais, uma resposta imune alternativa ao *M. tuberculosis* parece estar ativa.

No presente estudo, foram avaliados os diferentes subtipos de células imunológicas e as concentrações de citocinas no sítio da lesão tuberculosa em pacientes infectados pelo HIV e comparamos com pacientes imunocompetentes. Infelizmente, a carga viral e a contagem de células CD4 do soro de nossos pacientes não estavam disponíveis. No entanto, a tuberculose foi a primeira e única manifestação da infecção pelo HIV, sugerindo que eles não apresentavam uma depressão imunológica avançada. A tuberculose pleural ocorre freqüentemente em pacientes com contagem de células CD4 no sangue entre 200 e 350 células/mm<sup>3</sup>.<sup>(18)</sup> Os resultados demonstram que nestes pacientes, também no sítio da lesão tuberculosa, não há uma diminuição significativa da contagem de células CD4+. A redução da relação CD4/CD8 se deveu à infiltração de células CD8+.

**Tabela 1** - Anticorpos monoclonais utilizados para imunohistquímica

Anticorpo	Origem	Código	Diluição
CD4	Becton Dickson Mountain View, CA, USA	6320	1:80
CD8	Becton Dickson Mountain View, CA, USA c	7350	1:80
TCR-1	T Cell Sciences Cambridge, MA, USA	TA2061	1:50
FasL	Pharmigen San Diego, CA, USA	65320C	1:50
Perforina	Kamiya Biomedical Co Tukwila, WA, USA	MC550	1:50
Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo		Sigma Immuno	
Chemical St. Louis, MO, USA		B7401	1:50

**Tabela 2** - Valores medianos das percentagens de células positivas no tecido pleural de acordo com o status HIV

Célula	HIV+ (n=7)	HIV- (n=14)	Valor do p	IC 95%
CD4+	41 (23-62)	45 (33-61)	0,55	-18 a 10
CD8+	35 (30-41)	25 (14-48)	0,01	3 a 18
TCR+	7 (0-11)	9 (1-30)	0,40	-11 a 4
FasL+	7 (2-23)	6 (0-15)	0,71	-5 a 9
Perforina+	32 (13-50)	20 (7-34)	0,02	3 a 21

IC 95%: intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as medianas

**Tabela 3** - Valores medianos das concentrações de citocinas no líquido pleural de acordo com o status HIV

Citocina	HIV + (pg/ml) n=9	HIV - (pg/ml) n=20	Valor do p	IC 95%
IFN-	360 (0-1386)	296 (0-1448)	0,88	- 2,78 a 360
IL-2	24 (0-76)	1 (0-24)	0,25	0 a 47
IL-4	Não detectável	Não detectável	-	-
IL-10	76 (42-118)	67 (4-118)	0,36	- 16 a 36
IL-12	89 (30-256)	90 (0-174)	0,76	- 78 a 113

IC 95%: intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as medianas

Outros autores descreveram que, em pacientes com tuberculose ganglionar, o número de células CD8+ no linfonodo permanece inalterado a despeito do status HIV. Ao contrário, outros demonstraram que o número de células CD4+ nos locais de doença encontra-se diminuído em pacientes infectados pelo HIV com depressão imunológica avançada.<sup>(19,20)</sup>

Nossos achados parecem refletir características específicas da história natural da infecção tuberculosa na Aids em nosso país. Com efeito, a tuberculose pleural é uma manifestação inicial da infecção pelo HIV no Brasil, enquanto a tuberculose ganglionar é uma manifestação mais tardia, ocorrendo em pacientes com disfunção imunológica avançada.<sup>(21)</sup> Nos estágios iniciais da supressão imunológica, a citotoxicidade mediada por células CD8+ poderia ser um mecanismo alternativo para suprir a disfunção das células CD4+.

Nós também observamos um aumento na proporção de células perforina+ em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV. Esse achado sugere que a citotoxicidade mediada pela perforina pode desempenhar um importante papel na resistência ao *M. tuberculosis* durante os estágios iniciais da infecção pelo HIV.

Há poucos trabalhos na literatura avaliando o papel das citocinas do líquido pleural na resposta imune do hospedeiro. Barnes e colaboradores<sup>(2)</sup> descreveram que o RNA mensageiro de IFN-, IL-2 e IL-10 estava aumentado no líquido pleural e no soro de pacientes imunocompetentes com tuberculose pleural. Além disso, a concentração de IFN- estava aumentada no líquido pleural, enquanto que IL-2 e citocinas Th2 foram indetectáveis. O mesmo grupo demonstrou o aumento da concentração de IL-12 no líquido pleural de pacientes com tuberculose quando comparada com seus soros ou com líquidos pleurais de natureza maligna. Em nosso estudo, confirmamos que as citocinas IFN-, IL-10 e IL-12 são localmente secretadas na tuberculose pleural, enquanto IL-4 é indetectável. Entretanto, em contraste com os achados de Barnes e colaboradores<sup>(2)</sup>, a IL-2 foi detectada em alguns líquidos pleurais de nossos pacientes, embora em pequenas quantidades. Ademais, demonstramos que o padrão de produção destas citocinas é similar independentemente da co-infecção pelo HIV, embora não possamos excluir um modesto aumento nas concentrações de IL-2 em pacientes soropositivos.

O IFN- é secretado por uma variedade de células, incluindo as CD4+, as células dendríticas CD8+ e as células destruidoras naturais (NK). O reservatório natural de IFN- na tuberculose pleural é o linfócito CD4+.<sup>(22)</sup> Entretanto, camundongos com deficiência de células

CD4 têm níveis normais de IFN- quatro semanas após a infecção pelo *M. tuberculosis*, e os linfócitos CD8+ são a fonte de IFN- nestes animais.<sup>(23)</sup> No sítio de doença, tanto as células CD4+ quanto as células CD8+ sintetizam IFN- nos camundongos. Da mesma forma, de acordo com os nossos resultados, os linfócitos CD8+ podem ser os responsáveis pela produção de IFN- no espaço pleural de pacientes infectados pelo HIV.

Em resumo, a secreção de IFN- e outras citocinas do tipo Th1 no espaço pleural de pacientes infectados pelo HIV com tuberculose é comparável à dos pacientes imunocompetentes. Os linfócitos CD8+ parecem ter um papel importante na resistência ao *M. tuberculosis* durante os estágios iniciais da infecção pelo HIV, tanto pela secreção de interferon, quanto pelos mecanismos citotóxicos mediados pela perforina. A IL-2 pode ainda representar um mecanismo protetor alternativo em pacientes infectados pelo HIV.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roper WH, Waring JJ. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am Rev Tuberc* 1995;71: 616-34.
2. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993;61:3482-9.
3. Zhang M, Gately, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin-12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994;93:1733-9.
4. Kim YK, Lee SY, Kwon SS, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH. Gamma-interferon and soluble interleukin 2 receptor in tuberculous pleural effusion. *Lung* 2001;179(3):175-84.
5. Wongtim S, Silachamroon U, Ruxungham K, Udompanich V, Limthongkul S, Charoenlap P, Nuchprayoon C. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax* 1994;54(10):921-4.
6. Trajman A, Belo Neto E, Belo MTCT, Teixeira EG, Selig L, Ferrari G, Branco MM. Pleural tuberculosis and HIV co-infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:498-501.
7. Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. *Infect Immun* 1997;65:1317-20.
8. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;178:2243-7.

9. Stenger S, Mazzacaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. Differential effects of cytolytic T cells subsets on intracellular infection. *Science* 1997;276:1684-7.
10. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose, 1995, 4ª edição, p.11.
11. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. I Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J Pneumol* 1997;23:279-346.
12. Dye C, Scheele MS, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis. Estimate incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999;282:677-86.
13. Soares ECC, Oveira MFM, Dias SMO, Pio YE, Oliveira YR, Lauria LM e cols. Situação epidemiológica da tuberculose no município do Rio de Janeiro. *Pulmão RJ* 2002; 11 (2):51-6.
14. Saunders BM, Franl AA, Cooper AM, Orme IM. Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infect Immun* 1998;66:5508-14.
15. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997;65:4843-9.
16. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin-12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997;186(1):39-45.
17. Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin and lyse infected macrophages. *J Immunol* 2000;165(1):353-63.
18. Jones BE, Young SMM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Resp Dis* 1993;148:1292-7.
19. Müller H and Krüger S. Immunohistochemical analysis of cell composition and in situ cytokine expression in HIV- and non-HIV-associated tuberculous lymphadenitis. *Immunobiol* 1994;191:354-68.
20. Trajman A, Belo MTC, Teixeira EG, Neto EB, Spector N, Castello Branco MM. Pleural tuberculosis is an early manifestation of HIV disease in Brazil. X Intern Conf AIDS, Yokohama, Japan, 1994;vol.2, pp.165, abstract PB0673.
21. Shimokata K. Cytokines and local cellular immunity. *Nagoya J Med Sci* 1997;60:101-8.
22. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 1999;162:5407-16.
23. Feng CG, Bean AGD, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, in T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999;67(7):3242-7. ■