



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



I P E C
Instituto de Pesquisa Clínica
EVANDRO CHAGAS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MÁRCIA ANDRADE DA ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *DBP*
(*VITAMIN D-BINDING PROTEIN*) EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2007

Identificação de polimorfismos do gene *DBP* (*vitamin D-binding protein*) em pacientes com tuberculose pulmonar ativa no Estado do Rio de Janeiro

MÁRCIA ANDRADE DA ROCHA

Dissertação apresentada ao curso de Pesquisa clínica em Doenças Infecciosa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Rio de Janeiro

2007

MÁRCIA ANDRADE DA ROCHA

Identificação de polimorfismos do gene *DBP* (*vitamin D-binding protein*) em pacientes com tuberculose pulmonar ativa no Estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao curso de Pesquisa clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria da Glória Bonecini Almeida

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Maria José de Andrada Serpa
Doutora em Biofísica
Fundação Oswaldo Cruz/IPEC

Fátima Conceição
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Fundação Oswaldo Cruz/IOC

Rosely Maria Zancopé Oliveira
Doutora em Microbiologia
Fundação Oswaldo Cruz/IPEC

A Deus pelas inúmeras oportunidades de crescimento e pela sua presença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

A minha querida orientadora, Dra. Glória Bonecini, por me acolher, me ensinar, me acompanhar e me incentivar, por sua orientação, por ser o meu apoio, meu porto seguro, por sua competência, sensibilidade e carinho na condução deste estudo e pela compreensão nos momentos difíceis. Sendo fonte de aprendizado e motivação, meu respeito e admiração.

A você dedico esse trabalho.

Obrigada.

Aos meus pais, Joel e Walkyria que nunca mediram esforços para a realização de meus sonhos. Com todo amor e carinho sou grata por todo apoio e incentivo incessantes. Tudo o que sou, devo a vocês, meus amores, que Deus os abençoe.

Aos meus irmãos, Joel e Dayane, por seu carinho e companheirismo. Amo vocês.

Aos meus filhos queridos, razão da minha vida, por me proporcionarem tanta felicidade e amor.

A minha amiga, irmã e também “orientadora”, Ana Cristina C.S. Leandro, pelas contribuições valiosas a este trabalho e principalmente por sua doce presença, mesmo estando tão longe, oferecendo-me suas mãos amigas em diferentes momentos de minha vida acadêmica, profissional e pessoal. E ao seu esposo Marcelo, meu querido amigo e incentivador.

À amada tia Dilma, por seu enorme carinho e doçura.

A minha querida amiga Monique Lima, especialmente, por me socorrer nas horas difíceis e estar sempre pronta a ajudar. Você terá minha amizade para sempre.

A minha amiga Ana Teresa Fernandes (“Teteca”), pela torcida e pelo apoio no percurso deste estudo.

À Millena Rosalba que incansavelmente contribuiu para a realização deste trabalho.

A toda equipe do laboratório de Imunologia, meus amigos queridos, especialmente, Cynthia, Lalá, Márcio, Andréia, Carol, Carla, Danilo, Maíra, Sílvia e Leo, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Ao grupo de profissionais do IPEC e do Posto de Saúde Alberto Borgerth, pelo carinho e atenção. A todos que com empenho, entusiasmo e bondade contribuíram, direta ou indiretamente, para que este estudo se concretizasse e que fizeram parte do meu convívio no dia a dia, muito obrigada. Trabalhar com todos vocês foi imensamente gratificante, levo um pouco de vocês no coração.

A todos os voluntários, meus companheiros de jornada, por compartilharem comigo suas experiências repletas de desafios e esperança. Obrigada por me ajudarem a realizar essa tese.

A todos os participantes da banca

Obrigada!

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estava sempre começando,
A certeza de que era preciso continuar
E a certeza de que seria interrompido antes de
terminar

Fazer da Interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo...uma escada,
Do sonho... uma ponte,
Da procura um... encontro”

(Fernando Pessoa)

Andrade-Rocha, M. **Identificação de polimorfismos do gene *DBP* (vitamin D-binding protein) em pacientes com tuberculose pulmonar ativa no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

RESUMO

A tuberculose (TB) é a principal causa de morbi-mortalidade por doença infecciosa no mundo. Um terço da população mundial está infectada com o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e a cada ano ocorrem cerca de 9 milhões de novos casos com cerca de 2 milhões de mortes. Uma das principais perguntas ainda sem resposta na TB é o porquê de somente 1 em cada 10 indivíduos infectados desenvolvem esta doença. Existem três fatores de risco principais que contribuem no desenvolvimento desta infecção: i) o agente patogênico (principalmente seu grau de virulência), ii) fatores ambientais em que vive o hospedeiro e iii) o grau de susceptibilidade ao patógeno, vinculado a fatores genéticos. A associação destes três fatores determinam o grau de risco à infecção e adoecimento na tuberculose. Desta forma, este trabalho tem como objetivo identificar uma possível associação entre os polimorfismos do gene *DBP* codificador da proteína de transporte da vitamina D (VDBP) à susceptibilidade ou resistência ao Mtb. A VDBP é sintetizada no fígado e é uma proteína sérica multifuncional, cuja principal função é se ligar e transportar a VD até as células e tecidos alvo. Além disso, possui um importante papel na ativação de macrófagos (Gc-MAF), independente da sua ligação com a VD. Para realizar esse estudo, foram incluídos 160 pacientes com TB pulmonar HIV-1 negativos e 95 indivíduos controle. Dois polimorfismos no gene *DBP* localizados na posição 416 (*HaellI*) e 420 (*StyI*) foram tipados. Não observamos diferenças entre estes grupos em relação aos genótipos, apesar de encontrarmos valores próximos a significância para o HH ($p=0,08$; OR=1,6) e SS ($p=0,06$; OR=1,6), o que foi observado quando analisamos o fenótipo F/F (HS/HS, Asp/Thr-Asp/Thr) pode estar relacionado à susceptibilidade ao Mtb, uma vez que este fenótipo foi encontrado com maior frequência nos pacientes com TB do que nos indivíduos controle ($p=0,004$, OR=2,81). Nenhuma outra associação foi evidenciada em relação a outros fenótipo de VDBP. De modo interessante, quando indivíduos controles foram subdivididos em sadios (baixa exposição ao Mtb) e contactantes (alta exposição ao Mtb), vale salientar que esses dois grupos são compostos por indivíduos saudáveis, observamos que o fenótipo S/S (hS/hS, Glu/Thr –Glu/Thr) pode estar relacionado a resistência, pois os indivíduos sadios mostraram uma maior frequência deste fenótipo ($p=0,01$, OR=0,4). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, uma possível associação entre os polimorfismos no gene *DBP* nas posições 416 e 420 com TB, assim, a combinação destes genótipos e consequentes fenótipos poderá induzir uma forte associação com a susceptibilidade. Aspectos funcionais desta associação merecem mais estudos, bem como determinar o papel destes genótipos no controle intracelular do *M. tuberculosis* e os níveis de vitamina D em pacientes com tuberculose.

Palavras-chave: 1.Tuberculose. 2.Vitamina D. 3.Gcglobulin. 4.VDBP. 5.DBP. 6.Polimorfismos

Andrade-Rocha, M. **Identificação de polimorfismos do gene *DBP* (vitamin d-binding protein) em pacientes com tuberculose pulmonar ativa no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2007. Mastrer [Science dissertation in Clinic research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

ABSTRACT

The tuberculosis (TB) is the main cause of mortality infections diseases worldwide. One third of world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and about 9 million new cases occur each year with 2 million deaths. One of the main questions of TB is why only 1 out of 10 infected people develop the disease. There are three important risk factors that contribute to the development of this infection: i) the pathogenic agent (its virulence), ii) the environment where the host lives and iii) his/her susceptibility to the pathogen. The association among these 3 factors determines the risk factor degree to infection and illness to TB. Thus, this study had the objective to identify possible association among *DBP* gene polymorphisms that codifies the vitamin D binding protein (VDBP) to susceptibility or resistance to TB. The VDBP is synthesized in the liver and it is a multifunctional protein, which the most important function is to bind and transport the Vitamin D (VD) to the target cells and tissues. Besides, it has an important role on macrophages (Gc-MAF), independently of its association with the VD. This study included patients with pulmonary tuberculosis, HIV-1 negative and control individuals. We identified two polymorphisms on *DBP* gene localized in the 416 (*HaeIII*) and 420 (*StyI*) codons. We couldn't observe differences in these two groups in relation to the *DBP* genotypes, in spite of, we almost found the significance value to HH ($p=0.08$; OR=1.6) and SS ($p=0.06$; OR=1.6). The FF phenotype (HS/HS, Asp/Thr-Asp/Thr) could be related to susceptibility to TB, since this phenotype was observed in higher frequency in our pulmonary TB patients compared to the control group ($p=0.004$, OR=2.81). No more significance was found when we analyzed, in the specific groups, the others VDBP phenotypes. In interesting way, the phenotypes S/S (hS/hS, Glu/Thr –Glu/Thr) could be related to resistance to TB, once we observed a higher frequency in the healthy group (low TB exposition) compared to the contact group (high TB exposition) and is worth saying that in both subgroups the subjects are healthy. For the first time this study demonstrated an association between the 416 and 420 polymorphisms on the *DBP* gene with susceptibility to TB. Further studies are necessary to evaluate the functional aspects of this association as well as to determine the role of this genotypes in combat the intracellular Mtb and also, to measure the levels of Vitamin D in each TB patient.

Keywords: 1.Tuberculosis. 2.VitaminD. 3.Gc globulin. 4.VDBP. 5.DBP. 6.Polymorphisms

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos novos e taxa de incidência de tuberculose por 100.000 habitantes, Rio de Janeiro.....	6
Tabela 2: Afinidade de ligação entre os grupos de fenótipos de VDBP e Vitamina D e concentração plasmática de VDBP.....	27
Tabela 3: Dedução do fenótipo para o gene <i>DBP</i> a partir da associação dos resultados da digestão com as enzimas de restrição <i>Hae III</i> e <i>StyI</i>	45
Tabela 4: Distribuição de sexo, raça, idade e teste cutâneo ao PPD em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos controles.....	48
Tabela 5: Distribuição de sexo, raça, idade e teste cutâneo ao PPD em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos controles (contatos e sadios).....	51
Tabela 6: Distribuição dos genótipos e alelos para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles.	55
Tabela7: Distribuição dos genótipos e alelos para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles (contatos e sadios).....	56
Tabela 8: Distribuição fenotípica para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles.....	59
Tabela 9: Distribuição fenotípica para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles (contatos e sadios).....	60
Tabela 10: Distribuição dos haplótipos para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles.....	62
Tabela 11: Distribuição dos haplótipos para o gene <i>DBP</i> definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com TB pulmonar e em indivíduos controles (contatos e sadios).....	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, mostrando os genótipos do *loci DBP* tanto para o corte com a enzima de restrição *HaeIII* ou *StyI*..... 43
- Figura 3:** Análise fenotípica deduzida após caracterização dos genótipos identificados nos codons 416 (*Hae III*) e 420 (*Sty I*)..... 44
- Figura 4:** Exemplifica a associação dos genótipos obtidos pelos cortes com as enzimas de restrição *Hae III* e *Sty I* e dedução dos fenótipos..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: tuberculose
VD: vitamina D
Nramp1: gene de resistência de macrófagos
IFN- γ : Interferon gama
MBL:
VDR: receptor de Vitamina D
Th: T-auxiliar
VDBP: proteína de transporte da vitamina D
WHO: Organização Mundial de Saúde
OMS: Organização Mundial De Saúde
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
IUATLD: União Internacional Contra a TB e Doenças do Pulmão
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
DOTS: Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração
MS: Ministério da Saúde
PCT: Programa de Controle da Tuberculose
SES: Secretaria Estadual de Saúde
PPD: derivado protéico purificado
HSP: proteína do choque térmico
IL: interleucina
DCs: células dendríticas
TNF- α : fator de necrose tumoral
NO: óxido nítrico
ROIs: radicais intermediários de oxigênio
INOS: óxido Nítrico Sintase induzida
NOS2: óxido Nítrico Sintase induzida
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
TGF- α : Fator de crescimento transformante alfa
NK: células natural killer
IU: unidades internacionais
NF-AT: fator nuclear de ativação de células T
NF- κ B: fator nuclear Kappa
APCs: células apresentadoras de antígenos
EAE: encefalite auto-imune
IBD: doença intestinal inflamatória
Gc-MAF: fator de ativação de macrófagos
MODS: Disfunção Múltipla de órgãos
ARDS: Síndrome de stress respiratório agudo
T2DM: diabetes mellitus do tipo 2

CT: contactantes

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RFLP: Polimorfismos no comprimento de fragmentos

SUMÁRIO

1 <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	4
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	4
2.2 LATÊNCIA CLÍNICA E DOENÇA.....	6
2.3 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	8
2.4 VITAMINA D.....	14
2.5 VITAMINA D E O SISTEMA IMUNE.....	16
2.6 VITAMINA D E TUBERCULOSE.....	21
2.7 PROTEINA TRANSPORTADORA DE VITAMINA D (VDBP-“VITAMIN D BINDING PROTEIN”).....	25
3 <u>OBJETIVOS</u>	34
4 <u>METODOLOGIA</u>	35
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA.....	35
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	36
4.2.1 Pacientes com TB	36
4.2.2 Indivíduos Controles	36
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	37
4.3.1 Pacientes com TB	37
4.3.2 Indivíduos controles	37
4.4 EXAMES COMPLEMENTARES.....	38

4.4.1 Teste do PPD (Derivado de Proteína Purificada)	38
4.4.2 Sorologia para o HIV 1 e 2	38
4.4.3 Diagnóstico da Tuberculose	38
4.5 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>DBP</i>	39
4.5.1 Obtenção das amostras biológicas	39
4.5.2 Extração de DNA	40
4.5.3 Amplificação por PCR.....	41
4.5.4 Digestão com Enzimas de Restrição	42
4.5.5 Eletroforese em Gel de Agarose.....	43
4.5.6 Análise Estatística do Resultado	45
5 RESULTADOS	46
5.1 CASUÍSTICA.....	46
5.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS PARA O GENE <i>DBP</i>	52
5.2.1 Distribuição Genotípica	52
5.2.2 Frequência Alélica	53
5.2.3 Análise dos Fenótipos obtidos após associação dos polimorfismos do gene <i>DBP</i> nas posições 416 e 420	57
5.2.4 Análise dos Haplótipos para o gene <i>DBP</i> observado em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos controle	61
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES	75
PERSPECTIVAS	76
ANEXOS	77
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O agente etiológico da tuberculose (TB) (*Mycobacterium tuberculosis*) (*Mtb*) foi apresentado à comunidade científica por Robert Koch, em 1882. Em sua exposição à Sociedade de Fisiologia de Berlim, intitulada “A Etiologia da Tuberculose”, Koch demonstrou que o material infectado, quando observado ao microscópio, apresentava bacilos resistentes à descoloração pelos ácidos, os quais, quando incubados a 37°C em soro coagulado, davam origem em duas semanas, a colônias macroscopicamente observáveis. Estas, uma vez inoculadas em animais, provocavam lesões típicas da TB (Schulger, 2005).

Embora tenham sido descritos registros da presença da TB tão antigos como os encontrados em múmias do Antigo Egito e dos Maias, a TB só se tornou epidêmica na Europa feudal na Idade Média, fruto do aumento da densidade dos aglomerados populacionais, o que potenciou o contágio de indivíduo para indivíduo. Varrendo a Europa Ocidental até o final do século XIX, a “peste branca” se espalhou para os quatro cantos do mundo, causando milhões de mortes (Piedade João; Viveiros Miguel; Esteves Ainda, 2001). Os jesuítas foram responsáveis pela introdução da TB nas Américas, principalmente na do Sul, inclusive no Brasil (Brown e cols., 1981).

Desde o início do século XIX a TB tem o estigma de ser uma doença crônica relacionada ao desgaste físico, como demonstrado nos relatos de *consumption*, o que hoje é relacionado à desnutrição. Apesar de a TB não encontrar barreiras sócio-econômicas em nível mundial, atingindo países com renda *per capita* elevada, a capacidade de obter e dispor dos alimentos essenciais às necessidades básicas é fundamental para manter o equilíbrio imunológico (Chandra, 1997; Chandra, 1999; Chandra, 2002; Chandra, 2004; Jolly, 2004; Philpott & Ferguson, 2004) e assim controlar a multiplicação bacilar.

Tradicionalmente o estado nutricional é definido pela composição corporal, competência imunológica, concentração de proteínas plasmáticas e análises multivariadas que inclui as histórias alimentar e clínica (Blackburn e cols., 1979). As concentrações plasmáticas adequadas de vitamina D (VD) existem na dependência da ingestão da vitamina D2 e D3 e da biossíntese cutânea da VD, após exposição à luz ultravioleta (Gannagé-Yared e cols., 2000). Como não há relatos na literatura sobre os níveis séricos de VD na população brasileira, só é possível uma análise comparativa com os resultados descritos em populações européias, africanas e iranianas. Contudo, na maioria destes países os níveis séricos de VD estão relacionados com a estação do ano ou a exposição da pele ao sol. No inverno, onde a exposição da pele à luz solar é reduzida, a concentração sérica de VD também é reduzida, mesmo na população saudável, e este fato pode estar relacionado ao aumento, nesta estação do ano, no número de casos de TB (MacDonald & Swaminathan, 1988; McKenna, 1992; Douglas e cols., 1996). Assim, poderia ocorrer uma diminuição na função de monócitos e macrófagos (Davies, 1985), importante no controle intracelular do crescimento bacteriano.

Com o propósito de compreender os mecanismos responsáveis pela resistência ou susceptibilidade natural ao desenvolvimento da TB, alguns genes têm sido estudados a fim de identificar possíveis associações com a infecção; entre eles NRAMP1 (proteína de resistência natural associada a macrófagos), IFN- γ , HLA DR2 (antígeno leucocitário de histocompatibilidade), MBL (lecetina ligadora de manose) e receptor intracelular de VD (Hill, 1998).

Os efeitos da 1,25(OH) $_2$ D, forma ativa da VD, são mediados através do receptor de vitamina D (VDR) identificado em monócitos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T ativados (Bhalla, 1989; Provvedini, 1983; Fritsche e cols., 2000). Este receptor é essencial para que a vitamina D exerça sua ação indutora. O'Kelly e colaboradores (2002) defendem a idéia de que a expressão do VDR tem importante atividade na geração de resposta do tipo Th1(T-helper) (pró-inflamatória). Estudos voltados para a identificação de polimorfismos no gene que codifica para o VDR relacionados à resistência ou susceptibilidade ao *Mtb* mostram resultados ainda incertos.

No entanto, existe um outro fator ainda não descrito que é extremamente relevante para determinar possíveis marcadores de susceptibilidade ou resistência

para a TB que pode estar relacionado à deficiência no transporte de VD. Segundo resultados obtidos em nosso laboratório, os indivíduos com TB pulmonar ativa possuem níveis plasmáticos de VD dentro da faixa de normalidade, bem como foi demonstrado com os polimorfismos para VDR e nenhuma associação com a doença foi encontrada (Cardoso, 2004), indicando assim, que outros fatores podem estar relacionados e um destes alvos poderia ser a proteína de transporte de vitamina D (VDBP)

A VDBP é o principal transportador sistêmico tanto de 25(OH)D (forma inativa da VD) quanto de 1,25(OH)₂D (forma ativa da VD) e é essencial para a endocitose celular destes hormônios, bem como para sua regulação endócrina. A VDBP é uma proteína sintetizada no fígado e circula no plasma em concentrações 20 vezes maiores do que o total de metabólitos circulantes de VD. Vale salientar, que apenas 5% do total de VDBP existente no plasma humano normal encontra-se ocupado com os compostos da VD. Assim, em condições fisiológicas normais, praticamente todos os compostos de VD (forma ativa e inativa) estão ligados a VDBP, influenciando na farmacocinética da VD. Os níveis de VDBP no plasma diminuem sob condições patológicas tais como em doenças do fígado, síndrome nefrítica e desnutrição (Brown e cols., 1999). Desta forma, os efeitos imunoregulatórios do sistema endócrino de VD e a importância na expressão do gene *DBP*, que codificam a proteína de transporte da VD levaram à pesquisa sobre as variações deste gene e sua associação com a susceptibilidade ou resistência à várias doenças como: Doença de Graves, Tiroidite de Hashimoto, Diabetes Mellitus (Pani et al, 2002) e outras. Assim, a análise do polimorfismo neste gene e sua correlação com doenças infecciosas, principalmente aquelas onde o microrganismo depende do habitat intracelular no macrófago, poderá ser de suma importância para estudos relacionados à susceptibilidade à TB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A TB, doença tão antiga que quase se confunde com a própria história do homem, mantém-se como importante problema de saúde pública, sendo a principal causa de morbi-mortalidade por doença infecciosa no mundo (WHO, 2007). No ano de 2004 foram notificados de 8 a 9 milhões de novos casos e 3 a 4 milhões de mortes por TB no mundo (WHO, 2007), dentre esses casos, 18,5% em adultos (entre 15 e 49 anos - a fase mais produtiva na população mundial). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o *Mtb* infecta cerca de 32% da população mundial, o que indicaria um maior risco de adoecimento por reativação nesta população, além da ocorrência de nova infecção exógena (Kaufmann, 2006). Estima-se que entre 2002 e 2020 haverá em torno de um bilhão de pessoas infectadas no mundo, mais de 150 milhões de pessoas irão adoecer e 36 milhões irão morrer vítimas de TB se não for realizado um controle efetivo da doença (WHO, 2004).

A epidemia de TB foi negligenciada durante muito tempo, especialmente nos países desenvolvidos onde o número de casos da doença notificados eram reduzidos. Assim, com os avanços farmacológicos a doença deixou de ser um problema de saúde pública durante várias décadas, em países desenvolvidos (Raviglione, 2003).

Com a ocorrência da epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), no início dos anos 80, foi observada uma mudança na epidemiologia da TB no mundo. A imunossupressão induzida pelo HIV aumenta a susceptibilidade à TB em 50%, pois o controle do *Mtb* está diretamente relacionado ao sistema imune (WHO, 2004).

A partir de 1993, a TB foi declarada pela OMS como estado de emergência, o que levou à criação do programa "STOP TB", envolvendo instituições internacionais

de grande vulto como o Banco Mundial, o CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”), a União Internacional Contra a TB e Doenças do Pulmão (IUATLD), entre outras (Ruffino-Netto, 2002).

O Brasil é responsável junto com o Peru por 50% dos números de casos da América Latina. Infelizmente, pouco mais de 70% dos casos tratados estão sendo comprovadamente curados, e os quase 30% restantes constituem um perigo para o agravamento generalizado do problema e para o aumento de formas da doença resistentes às drogas (Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SINAN, 2005).

A OMS passou a recomendar a estratégia DOTS (Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração), como a mais eficaz para alcançar o controle da TB. Em 1998, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil lançou o Plano Nacional de Combate à TB que, reconhecendo a prioridade do problema, propunha a implantação da estratégia DOTS e tinha como metas implementar a cobertura do Programa de Controle da Tuberculose (PCT) em 100% dos municípios, diagnosticar 92% dos casos estimados e tratar 85% dos casos diagnosticados. Um ano depois, a taxa de incidência da TB no Brasil foi de 48 casos por 100 mil habitantes, enquanto o mesmo indicador nos EUA situava-se no patamar de 7,9 casos por 100 mil habitantes por ano. Isto significa que ainda são necessárias medidas rigorosas, adotadas a longo prazo, para que se possa intensificar o combate e se aproximar dos padrões dos países desenvolvidos. Todavia, dados mais recentes publicados pelo MS no Brasil, indicam que a taxa de incidência de tuberculose vem se mantendo estável nos últimos anos, 55/100.000 habitantes em 2000, com cerca de 90.000 casos notificados a cada ano (SES-RJ, 2005). Desta forma, a incidência de TB no Brasil encontra-se próximo a taxa mundial (60/100.000, WHO, 2007) elevando nosso país ao primeiro lugar em casos notificados de tuberculose nas Américas (SINAM/MS, 2007) e a ocupar a 15ª posição no ranking dos 22 países com maior número de casos estimados de TB.

Apenas na região Sudeste ocorrem 48,3% dos casos notificados, o Rio de Janeiro é o estado que apresenta a mais alta taxa de incidência de TB do país. A cada ano são notificados em média 16.000 casos de TB. Os 32 municípios prioritários concentram 95% dos casos de TB e a região metropolitana é responsável por 86% dos casos notificados (SES-RJ, 2005), como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Número de casos novos e taxa de incidência de tuberculose por 100.000 habitantes, Rio de Janeiro, no período de 1995-2003. Fonte: SINAN. SES-RJ

Ano	Nº.casos novos	Taxa de incidência (%)
1995	11770	88,5
1996	13211	98,5
1997	12933	95,4
1998	12655	92,5
1999	12530	90,7
2000	13126	91,2
2001	13314	91,5
2002	13531	91,9
2003	13015	87,5

Pode-se dizer que o curso da ampliação do problema pode ser reversível desde que tomadas medidas urgentes e inovadoras em várias frentes, principalmente por parte da comunidade científica em tentar compreender os possíveis mecanismos que levam ao adoecimento pela TB em somente 5 a 10% dos indivíduos infectados. Da mesma forma, novas estratégias para prevenção e diagnóstico da TB são necessárias e isto requer uma melhor compreensão das interações entre o *Mtb* e o hospedeiro, que culmina numa infecção latente assintomática ou o aparecimento da doença nas suas formas ativas pulmonares e/ou extra pulmonares (Sly e cols, 2003)

2.2 LATÊNCIA CLÍNICA E DOENÇA

O curso do desenvolvimento da infecção pelo *Mtb* pode seguir duas vias: a doença ativa ou a infecção latente, também denominada de latência clínica. Esta bipolarização, após a infecção, ocorre devido a um conjunto de fatores ambientais, genéticos e imunológicos, até o momento pouco conhecidos (Hartmann & Plum, 1999; Boom e cols., 2003). Além disso, outros fatores também contribuem para a

reativação da doença, como a imunossupressão, idade avançada, uso de corticóides e má nutrição/desnutrição (Selwyn e cols., 1989).

Após a infecção, um pequeno percentual, cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados, progride para a TB primária, num período de 1 a 2 anos, e a maioria (90-95%) exibe a forma latente da doença, sem apresentar sintomatologia e são identificados somente pela resposta positiva ao teste cutâneo ao derivado protéico purificado (PPD) (Hartmann & Plum, 1999). Dessa forma, a infecção latente pode ser mantida por toda vida do hospedeiro sem sintomas clínicos e compreende cerca de um terço da população mundial.

Nos últimos anos, o estado de dormência do *Mtb* tem despertado a atenção dos pesquisadores, aumentando o interesse no estudo das vias enzimáticas (McKinney e cols., 2000) necessárias para a adaptação do patógeno em condições ambientais modificadas, como baixa pressão de oxigênio (Glickman e cols., 2000) e regulação de genes envolvidos na resposta ao *stress* (Ando e cols., 2003; Chen e cols., 2000) sofrido pela micobactéria. Apesar do grande número de estudos, ainda não ficou claro se a latência do bacilo é causada por uma adaptação, devido ao baixo metabolismo ou pela constante relação entre o sistema imune e a persistência do patógeno, sendo mediada por células T antígeno específicas e por fagócitos mononucleares (Ulrichs e cols., 2005).

A resposta organizada pelo sistema imune contra o *Mtb*, influencia de forma decisiva no curso da doença. Haja visto, que pessoas imunocomprometidas, especialmente indivíduos HIV-positivos têm um risco maior (5% ao ano) de desenvolver a forma ativa da TB após serem infectados (Selwyn e cols., 1989; Enarson & Murray, 1996).

O patógeno se replica depois de infectar os pulmões do hospedeiro no interior de macrófagos e rapidamente após a infecção, a resposta imune adaptativa é gerada. Estudos em modelos humanos e em animais têm indicado que células T CD4 e CD8 são ativadas em resposta a infecção pelo *Mtb* produzindo citocinas que contribuem de várias maneiras, incluindo na ativação de macrófagos (Flynn, 2004).

Os granulomas consistem de células T CD4 e CD8 e células B, cercadas por macrófagos, alguns dos quais contendo o *Mtb* (Flynn, 2004). Segundo Chan e colaboradores (2004), um processo granulomatoso pode persistir por anos e eficientemente manter o *Mtb* em estado de dormência, desde que o sistema imune se mantenha imunocompetente. Assim, o granuloma provavelmente serve como

uma espécie de nicho para o *Mtb*. Um outro dado importante é que o granuloma priva o *Mtb* de nutrientes e oxigênio e como consequência direta, este modifica o seu perfil gênico e sobrevive em estado de dormência nas lesões granulomatosas. É provável que alguns desses produtos gênicos, tais como a *alfa-cristalin* e a proteína do choque térmico (Hsp), sirvam como principal antígeno ligado à dormência (Kaufmann & McMichael, 2005)

A latência clínica da TB pode ser considerada como um equilíbrio entre o sistema imune e o *Mtb*, isto é, se esta resposta for eficiente, ou seja, conseguir conter a replicação do bacilo, este será destruído e a infecção controlada, caso contrário, poderá ocorrer multiplicação no meio intracelular, levando ao desenvolvimento da infecção primária ou doença pulmonar ativa (Saunders e cols., 2002) mais freqüentemente vista em adultos como uma doença pulmonar com infiltrado ou cavidade no ápice do pulmão. Esta é a mais freqüente forma de TB em adultos (Smith e cols., 2004). A compreensão da latência e da reativação da TB, em relação ao hospedeiro e ao bacilo, é crucial para o controle mundial da doença.

2.3 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE

Indivíduos imunocompetentes podem controlar o desenvolvimento da TB através de duas linhas de defesas específicas. A primeira linha de defesa do sistema imunológico contra microrganismos invasores é formada por células polimorfonucleares e monócitos. Quando o *Mtb* atinge o sistema respiratório inferior, é capturado por estas células de defesa. Os macrófagos são os principais responsáveis na ativação de uma resposta imune específica contra a TB. Inicialmente eles se aderem e realizam a fagocitose da micobactéria. Os macrófagos infectados liberam interleucina (IL) 12 e 18, que estimulam predominantemente os linfócitos T CD4 a liberarem IFN- γ (Ellner, 1997), que por sua vez estimula a fagocitose do *Mtb* pelos macrófagos. Um outro mecanismo antimicobacteriano dos macrófagos é a fusão do fagolisossoma. O lisossoma contém numerosas enzimas

hidrolíticas e é uma organela muito ácida, assim sendo a fusão do lisossoma com o fagossoma contendo a bactéria ingerida é um mecanismo primário pelo qual o macrófago controla a infecção. Essa fusão é aumentada quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ ou demais citocinas (Mckinney e cols., 2000). Relatos na literatura demonstraram que células dendríticas (DCs) também estão envolvidas na proteção contra o *Mtb*, como principais apresentadoras de antígenos (Demangel e cols., 1999). A transferência de DCs infectadas pelo BCG em camundongos levam a uma rápida resposta de IFN- γ contra antígenos micobacterianos, induzindo uma potente imunidade (Demangel e cols., 1999; Tascon e cols., 2000). Esses dados sugerem que durante a infecção as DCs localizadas nos pulmões migram para os linfonodos onde apresentam os antígenos para as células T e promovem a expansão de células T CD4 secretoras de IFN- γ . A estimulação da produção de IL-12 por DCs por antígenos micobacterianos pode representar a principal via para iniciar uma resposta potencialmente protetora. A segunda linha de defesa do sistema imunológico é composta pela resposta humoral específica e pela imunidade mediada por células. Esta resposta específica contra o bacilo é considerada o principal mecanismo de defesa contra organismos intracelulares como o *Mtb*, e os antígenos apresentados pelos macrófagos levam à estimulação tanto de linfócitos T CD4 como de linfócitos T CD8 (Saunders e cols., 2002). Essa interação entre os linfócitos T e macrófagos é crucial na defesa do organismo contra os patógenos intracelulares (Abbas e cols., 1996).

Antígenos do *Mtb* induzem a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α), que desempenha importante função no controle da TB através da formação dos granulomas, que é um processo de contenção do foco infeccioso gerando uma lesão pulmonar (Frieden e cols., 2003). Na ausência de TNF- α ou do receptor para TNF- α , a resposta granulomatosa é deficiente, ocorrendo uma aguda infecção pelo *Mtb* em murinos. Os granulomas formados são desorganizados com poucos macrófagos ativados (Flynn e cols., 1995) e a colonização de linfócitos e macrófagos não é ideal para conter a infecção (Bean AGD e cols., 1999). Cadranell e colaboradores (1990), descreveram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com TB que apresentavam caquexia e alto grau de febre produziam uma maior quantidade de TNF- α do que as células de indivíduos com TB sem tais sintomas, sugerindo que o TNF- α possui uma função importante na imunopatologia da TB. Por outro lado, a

produção de TNF- α por macrófagos infectados é dependente da cepa de micobactéria que os infecta (Chatterjeer e cols., 1992; Zhang e cols., 1995), sendo constantemente citado como o principal fator na injúria tecidual pulmonar (Rook e cols., 1987 e 1990; Moreira e cols., 1997). Assim sendo, o IFN- γ e TNF- α , representam o principal mecanismo através do qual são induzidas substâncias que controlam o crescimento intracelular micobacteriano, como o óxido nítrico (NO) e radicais intermediários de oxigênio (ROIs). Essas substâncias são produzidas principalmente por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (Henderson e cols., 1997; Ladel e cols., 1997; Barnes e cols., 1993). Bonecini-Almeida e colaboradores, (1998 a e b) demonstraram uma elevada expressão de NOS induzida (iNOS ou NOS2) em pacientes com tuberculose pulmonar, bem como associado à atividade micobactericida em macrófagos infectados com *Mtb* previamente estimulados com IFN- γ e contendo linfócitos do sangue periférico. A função relevante do NOS2 na TB também foi observada em estudos realizados em camundongos com deficiência nesta enzima. Os animais exibiram maior susceptibilidade para a infecção aguda ou crônica pelo *Mtb*, quando comparados a camundongos selvagens (Chan e cols., 1995).

A resposta protetora ao *Mtb* requer imunidade mediada por células. Este patógeno reside no interior de macrófagos e por isso, os mecanismos efetores exercidos pelas células T são mais importantes na resposta imune do que os anticorpos. Depois de uma semana de infecção com *Mtb* o número de células T CD4 e CD8 que chegam aos pulmões vindas dos linfonodos aumentam (Feng e cols., 1999; Serbina e cols., 2000). Entre a segunda e a quarta semana após infecção, as células T CD4 e CD8 migram para os pulmões e demonstram capacidade efetora e de memória (Serbina e cols. 1999; Feng e cols., 1999). Isso indica que células T ativadas migram para o sítio de infecção e interagem com células apresentadoras de antígenos.

As células T CD4 possuem o papel principal na contenção da infecção pelo *Mtb*. Os antígenos do *Mtb* são apresentados pelos macrófagos pelo MHCII para células T CD4 que se encarregam de ativar linfócitos B e de os estimularem a sintetizar e liberar anticorpos. A ação das citocinas pode desencadear ainda uma resposta inflamatória, que dependendo de sua intensidade, pode contribuir para o agravamento da patologia da TB (Wadee e cols., 1993). As células T CD4 reativas ao

Mtb são facilmente detectadas em indivíduos expostos às micobactérias, pela demonstração da hipersensibilidade cutânea ao PPD *in vivo* e pela elevada resposta linfoproliferativa aos antígenos micobacterianos *in vitro*. A resposta de células T se correlaciona inversamente com a progressão da doença, verificando-se uma baixa resposta linfoproliferativa e inexistência de reação cutânea ao teste PPD em pacientes com TB pulmonar avançada (Toossi e cols., 1986). Estudos realizados por Muller e cols. (1987), em camundongos deficientes para células T CD4 demonstraram que esse grupo de células é necessário para o controle da infecção. A epidemia de HIV tem demonstrado que a perda de células T CD4 aumenta consideravelmente a susceptibilidade a TB em hospedeiros humanos (Keane e cols., 1997)

Vários estudos têm demonstrado que a infecção pelo *Mtb* inibe a apresentação de antígenos para as células T CD4, através do MHCII, esse fato contribui para a incapacidade do hospedeiro em eliminar a infecção persistente. No entanto, a inabilidade das células T CD4 para eliminar o *Mtb* pode ser devido à falta de reconhecimento ou ativação de macrófagos infectados (Gong J-H e cols., 1996; Rojas RE, 1999).

Durante muitos anos o foco das pesquisas em relação as células T, foram as células T CD4, porém nos últimos anos as células T CD8 passaram a receber atenção. Essas células reconhecem os antígenos micobacterianos através do MHCI, e esse antígenos são frequentemente derivados do citoplasma dessas células. Contudo, o *Mtb* não reside no citoplasma mas em vacúolos dentro das células infectadas. Estudos sugerem que o bacilo dentro dos vacúolos pode ter acesso ao citoplasma, usando para isso, poros encontrados nas membranas desses vacúolos (Mazzaccaro e cols., 1996; Teitelbaum e cols., 1999).

A lise das células infectadas com o *Mtb*, pelas células T CD8 citotóxicas ocorre através da via perforina/granzima ou pela via Fas/FasL (Stenger e cols., 1997). Essas células citotóxicas são estimuladas a provocar a lise de macrófagos infectados com micobactérias, exercendo uma ação importante na defesa contra a TB ao liberar os bacilos do meio intracelular para serem destruídos por outros macrófagos já ativados ou induzir a apoptose com a destruição da bactéria, evitando que possam infectar novas células. Contudo em humanos as células T CD8 também produzem granulocimas, que penetram nos macrófagos por poros feitos pelas perforinas, sendo diretamente tóxicas para o *Mtb* e representando dessa

forma, um mecanismo pelo qual as células T CD8 contribuem para a morte dos bacilos dentro das células infectadas (Stenger e cols., 1997 e 1998).). Em consequência da ação citotóxica dos linfócitos T CD8 os bacilos são eventualmente liberados para muitas partes do corpo, tais como fígado, baço, meninges, ossos, rins e linfonodos, onde eles podem ser a fonte de disseminação da TB ou mais comumente ficarem dormentes no organismo ((Wadee e cols., 1993; Girard e cols 2005).

O importante papel das células T CD8 na proteção contra a TB foi sugerido através de diferentes experimentos. A depleção destas células, feita por anticorpos monoclonais, aumenta a infecção pelo *Mtb* em camundongos. Esse grupo de células também é capaz de transferir níveis moderados de proteção contra a TB quando isoladas na fase precoce da infecção (Bonato e cols., 1998). Contudo, foram relatadas evidências diretas do envolvimento destas células T CD8 citotóxicas, na defesa do hospedeiro contra o *Mtb* em humanos, esse fato sustenta as atuais tentativas de gerar resposta T citotóxica contra o *Mtb* pela vacinação (Lalvani e cols., 1998). Experimentos realizados em camundongos têm revelado a necessidade de células T CD8 no controle da infecção pelo *Mtb* (Flynn e cols.,1992; Behar e cols., 1999). Por outro lado, pesquisadores têm reportado que células T CD8 não são necessárias para o controle da infecção pelo *Mtb* (Mogues T e cols., 2001).

Os linfócitos T CD4 e T CD8 humanos apresentam dicotomia quanto à produção de citocinas, similar ao modelo murino. Assim, as citocinas produzidas por linfócitos T CD4 e T CD8 do tipo Th1 secretam IFN- γ , IL-2, IL-3, e TGF- α , enquanto que linfócitos T CD4 e T CD8 do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-4.

A atuação de cada um destes hormônios celulares resulta em diferentes espectros de ativação ou desativação celular. Foi demonstrado que o IFN- γ , mediador da ativação de macrófagos produzido inicialmente por células NK ou células T, as quais são estimuladas por IL-12 proveniente de macrófagos infectados, é capaz de induzir atividade micobactericida em macrófagos humanos (Bonecini-Almeida e cols., 1998a). A IL-12 promove uma importante ligação entre imunidade inata e adaptativa essencial para a proteção contra o *Mtb* (Cooper e cols., 1993), sendo necessária para a sensibilização de uma resposta T-helper (TH1) por células T CD 4, além de estimular a produção de IFN- γ por essas células (Henderson e cols., 1997). Humanos com mutações no gene IL-12 ou no seu receptor apresentam redução na

produção de IFN- γ por células T sendo mais susceptíveis a infecção pelo *Mtb* (Saunders e cols., 2002). Sabe-se, que a IL-12 é um heterodímero composto de 2 subunidades (p40 e p35) e é produzida por células apresentadoras de antígeno, tal como macrófagos e células dendríticas após a ativação de receptores *Toll-like* pelos ligantes bacterianos (Aderem & Ulevitch, 2000). Alguns autores sugerem que os níveis de IFN- γ são diminuídos em pacientes com TB ativa (Zhang e cols., 1995).

Citocinas do tipo Th2, como a IL-10, atuam como potentes inibidores da atividade celular inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α), *burst* respiratório e a expressão de receptores para IL-1 e MHC II (Wallis e cols., 1990; Ogawa e cols., 1991). A TB humana ainda está sendo alvo de estudo para a determinação do padrão de citocinas que predomina durante a evolução desta doença. O balanço entre citocinas do tipo Th1, ditas como inibitórias (IFN- γ , TNF- α), ou do tipo Th2, ditas como aceleradoras do crescimento micobacteriano (IL-4, IL-10), pode ser importante na regulação da atividade micobactericida em macrófagos infectados pelo *Mtb*. Bonecini-Almeida e cols., (1997), demonstraram que células alveolares de pacientes com TB pulmonar ativa expressam citocinas Th1 (mRNA IL-2 e IFN- γ), em um ambiente também dito como Th2, pela presença de mRNA de IL-10 e IL-4. Segundo Bonecini-Almeida e cols., (2004), apesar de ter identificado a existência de óxido nítrico sintase induzida nos alvéolos pulmonares dos pacientes, não foi possível demonstrar a presença de radicais de nitrogênio (nitrito e nitrato) no fluido do lavado broncoalveolar ou mesmo em culturas de células alveolares estimuladas ou não com doses crescentes de IFN- γ , possivelmente pela ação de IL-4 e IL-10, presentes em grandes quantidades nos mesmos. Da mesma forma, o equilíbrio IFN- γ e IL-10 regula o crescimento intracelular dos bacilos no interior dos macrófagos (Bonecini-Almeida e cols., 1998a).

A interleucina 1 (IL-1) é responsável pelos estados febris característicos da TB (Dinarello, 1984) e pelo aumento da resposta inflamatória com indução de outras citocinas, como IL-6 e TNF- α , que estimulam a proliferação de células T pelo controle da expressão de receptores de IL-2 nestas células e produção desta mesma citocina (Platanias & Vogelzang, 1990). A importância da IL-1 na resposta imune antimicobacteriana ainda apresenta controvérsias, alguns estudos sugerem que esta citocina pode contribuir para a imunossupressão em alguns pacientes (Fujiwara e cols., 1986). Uma possibilidade que corrobora com essa sugestão, é que a produção

excessiva de IL-1 resulta na expressão de receptores de IL-2 em monócitos os quais podem levar à inibição da proliferação de linfócitos T através do consumo de IL-2 (Toossi e cols., 1990).

Entender a imunidade do hospedeiro humano para a TB torna-se importante por inúmeras razões. No entanto, devemos saber que somente através do conhecimento de como a TB é reconhecida e controlada pelo sistema imune, poderemos desenhar e avaliar novas vacinas candidatas. Felizmente, a vacinação ainda representa uma importante meta no controle da TB, e quem sabe talvez, esta seja a melhor esperança para a erradicação da TB (Schluger 2001).

2.4 VITAMINA D

A VD é um dos hormônios sintetizado pelas formas mais ancestrais de organismos, por mais de 750 milhões de anos. Fitoplanctons, zooplanctons e muitas formas de plantas e animais que são expostos a luz solar possuem a capacidade de sintetizar a VD.

A VD é uma substância lipossolúvel, chamada de secosteróide, pelo fato de possuir um dos anéis aromáticos quebrado. São reconhecidos dois secosteróides naturais: ergocalciferol ou vitamina D₂ (25(OH)D), e colecalciferol ou VD₃ (1,25(OH)₂D) que são derivados da clivagem fotolítica dos anéis B do ergosterol e 7-dehidrocolecalciferol, na pele (Brown e cols., 1999). A síntese cutânea da substância ativa a partir da pró-vitamina D₃ ocorre na epiderme, por irradiação de luz ultravioleta, e depende de fatores como o tempo de exposição da pele ao sol, momento do dia em que ocorre a exposição, pigmentação da pele, idade, uso de filtro solar, estação do ano, poluição atmosférica, situação geográfica e má absorção intestinal (McKenna, 1992; Roncada, 2000; Douglas, 2002; Holick, 2003). Contudo, após a sua bioativação na pele, os precursores da VD, que são substâncias inertes, necessitam ainda serem submetidos a uma seqüência de hidroxilações para se transformarem na forma biologicamente ativa. O primeiro processo de hidroxilação ocorre no fígado e o segundo e mais importante ocorre nos rins. Essa segunda,

hidroxilação dá origem ao hormônio definitivo com maior atividade fisiológica, denominado 1,25-diidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D), também chamado calcitriol (Roncada, 2000; Douglas, 2002), bem como, outro isômero inativo – 24,25 diidroxicolecalciferol (Ustianowski e cols., 2005). A forma ativa da VD, após ser sintetizada nos rins, é transportada para os tecidos alvos tal como ossos e intestino; onde desempenham seu papel na homeostase de cálcio e fosfato, bem como atuam na proliferação e diferenciação celular (Tashiro e cols., 2004), na modulação da resposta imune (Piemonti e cols., 2000) e no metabolismo ósseo pela absorção de cálcio (Sawada e cols., 2001).

As necessidades diárias de VD podem ser obtidas a partir de quantidades apropriadas na alimentação. Como fontes de VD temos: a gema de ovo, arenque, cavala, salmão, sardinha, atum, derivados lipídicos do leite e óleo de fígado de bacalhau. Em geral, recomenda-se 5 a 30 minutos de exposição diária da pele ao sol para manter níveis satisfatórios de VD circulante (Holick, 2003).

É importante lembrar que atualmente alguns alimentos são industrialmente enriquecidos com VD (Roncada, 2000; Douglas, 2002; Holick, 2003). No Brasil, por exemplo, podem ser citados leite em pó, achocolatados em pó, suplementos alimentares do tipo Sustagem[®], Nutren[®]Active e similares, farinha láctea, farinhas de milho e de arroz, flocos de cereais.

Como preconizado, a quantidade diária necessária de VD recomendada em 1998 pelo “Food and Nutrition Board Institute of Medicine” é 200 IU para crianças, 400 IU adultos homens e mulheres até 51 anos. Para mulheres com mais de 51 anos e homens com mais de 70, a recomendação é de 600 IU/dia ou 800 IU/dia, respectivamente (Norman, 2000).

Para determinar o estado desta vitamina num indivíduo, a melhor maneira é dosar a concentração sérica de 25(OH)D cuja concentração normal é, geralmente, descrita entre 20 e 150 nmol/L que equivale manter-se entre 8 e 60 ng/mL (Holick, 1987). Contudo, Lips e cols. (2004) descreveram que níveis de 50 nmol/L ou 20 ng/mL são considerados apropriados e classificam a deficiência de VD como: deficiência leve, quando a concentração de 25(OH)D se encontra entre 50 e 25nmol/L; deficiência moderada, quando a concentração se encontra abaixo de 25 nmol/L e; deficiência grave, quando a concentração se mostra abaixo de 12,5

nmol/L. Esta vitamina é criticamente importante para o desenvolvimento, crescimento e manutenção do esqueleto (Holick, 2003).

2.5 VITAMINA D E O SISTEMA IMUNE

A forma ativa da VD, 1,25-dihidroxitamin D3 (1,25(OH)₂D), não regula apenas o metabolismo dos ossos e do cálcio, mas exerce outras atividades biológicas, incluindo imunomodulação através do receptor de VD (VDR), um membro da superfamília de receptores nucleares de hormônios. A descoberta de que o VDR é constitutivamente expresso em células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e DCs e é expresso de forma induzida em linfócitos ativados sugere um importante papel da VD no sistema imune (Mathieu e cols., 2002). Esta regulação é mediada através de fatores de transcrição nuclear, como NF-AT e NF- κ B ou por interação direta com elementos respondedores à VD na região promotora dos genes de determinadas citocinas produzidas por células do sistema imune (Mathieu e cols., 2002).

Em relação aos efeitos da VD em monócitos, estes apresentaram importante inibição da expressão das moléculas de MHC II, diminuindo, dessa forma, a sua capacidade de ativar células T (Xu e cols., 1993). Contudo, em contraste com a atenuação da apresentação de antígenos, a quimiotaxia e a capacidade fagocítica de monócitos e macrófagos necessárias para a citotoxicidade de células tumorais e atividade microbactericida dessas células é intensificada pela exposição à VD (Xu e cols., 1993). Além disso, em macrófagos ativados, a enzima responsável pela síntese da forma ativa da VD, a 25(OH) D3-1- α -hidroxilase, é expressa (Overbergh e cols., 2000), tornando-os hábeis para sintetizar e secretar a forma ativa da VD (1,25(OH)₂D). Embora a enzima encontrada em macrófagos seja idêntica à conhecida forma renal, a sua expressão é regulada de forma diferente. A 1- α -hidroxilase renal é regulada por mediadores de cálcio e de homeostase óssea, todavia esse fenômeno nos macrófagos ocorre sobre o controle de sinais imunes, tais como o IFN- γ (Hewison e cols., 2003). Porém, macrófagos e DCs não

apresentam *feedback* negativo para a produção de VD, explicando a ocasional hipercalcemia em situações em que ocorre uma hiper ativação de macrófagos. A VD tem a capacidade de inibir potencialmente a maturação de DCs por um mecanismo dependente de VDR (Penna e cols., 2000). O efeito da VD em relação às DCs, está relacionada a diminuição da expressão de receptores co-estimulatórios (CD40, CD80 e CD86), responsáveis pela produção de sinais secundários, necessários para a total ativação de células T (Halteren e cols., 2002). Em experimentos realizados *in vitro*, demonstraram que a diferenciação de DCs a partir de seus precursores (monócitos humanos ou precursores derivados da medula óssea de murinos) é inibida pela VD e em alguns casos observou-se aumento de células CD14 positivas, que são marcadores de superfície de monócitos. Dessa forma, a função de apresentação de antígenos é severamente alterada pela VD (D'Ambrósio e cols., 1998).

A secreção de citocinas pelas APCs que são cruciais para o recrutamento e ativação de linfócitos T, também são influenciadas pela VD. A IL-12, principal citocina envolvida na direção em que o sistema imune será ativado (Th1 ou Th2), é claramente inibida pela VD em DCs, como em outras APCs (D'Ambrósio e cols., 1998). A IL-12 estimula o desenvolvimento de linfócitos T CD4 Th1 e inibe o desenvolvimento de T CD4 Th2. Devido à inibição de IL-12, observada *in vitro* e *in vivo*, a VD é capaz de interferir diretamente com os eventos da cascata imune mudando o perfil de resposta Th1 para Th2 (Penna e cols., 2000; Halteren e cols., 2002). Todavia, a expressão de IL-10 (citocina anti-inflamatória), oposta a resposta Th1, encontra-se aumentada após o tratamento com VD (Penna e cols., 2000; Halteren e cols., 2002). Além disso, a VD inibe a produção da IL-2 que é um fator de desenvolvimento autócrino de linfócitos T, dessa forma, previne a ativação e proliferação dos mesmos, induzindo a um perfil de resposta tipo Th2 (Takeuchi e cols., 1998). Boonstra e colaboradores (2001) demonstraram o desenvolvimento de linfócitos Th2 com aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 após tratamento *in vitro* com VD.

Outros fatores secretados pela APCs também são influenciados pela VD. A expressão da citocina TNF- α por monócitos e macrófagos também é modulada pela VD. Em geral o estágio de diferenciação e maturação dessas células determina a sua resposta à VD, assim, a produção de TNF- α é aumentada em células imaturas e em células da medula óssea (Hakim e cols., 2003), por outro lado, nota-se uma

diminuição da produção de TNF- α após o tratamento de células maduras, como em células mononucleares, com VD (Panichi e cols., 2003).

Funcionalmente, a capacidade de APCs para induzir ativação de linfócitos T, proliferação e secreção de citocinas é profundamente modificado pela VD (Penna e cols., 2000). Linfócitos T virgens apresentam completa hiporesponsividade (inibição da proliferação e produção de citocinas) *in vitro* na presença de DCs tratadas com VD (Penna e cols., 2000). Além disso, estudos realizados por Penna e colaboradores (2000) e Halteren e colaboradores (2002), demonstraram que linfócitos humanos T CD4 autoreativos podem ser afetados por DCs tratadas com VD, apresentando diminuição na produção de IFN- γ , sugerindo um redirecionamento para o perfil de citocinas Th2. A VD *in vivo*, pode induzir propriedades tolerogênicas nas DCs, como foi demonstrado em modelos de rejeição de transplantes e autoimunidade (Gregori e cols., 2001). Após o tratamento com uma combinação de VD e mofetil micofenolato (imunossupressor), *in vivo*, pode-se observar a geração de DCs tolerogênicas, provavelmente responsáveis pelo aumento no número de linfócitos T regulatórios encontrados nos linfonodos regionais (Gregori e cols., 2001). Contudo, é comumente aceito que a indução de linfócitos T regulatórios pela VD, ocorre indiretamente, através de DCs tolerogênicas. Estudos em encefalomielite autoimune (EAE) relatam que APCs *in vitro* cultivadas com uma combinação de VD e dexametasona (imunossupressor) pode induzir diretamente a produção de IL-10 por linfócitos T reguladores, prevenindo a demielinação em uma via antígeno específica (Barrat e cols., 2002).

Como a VD possui efeito imunomodulatório, é possível encontrar diversos trabalhos que descrevem a funcionalidade dessa vitamina quando presente em níveis considerados normais, assim como os efeitos da sua carência no sistema imune. Chan e colaboradores (2000) sugerem que sua deficiência pode levar ao mau funcionamento desse sistema. Pessoas com severa deficiência de VD são mais susceptíveis a infecções, como a TB. Estudos relatam funções defeituosas de macrófagos, como a quimiotaxia, fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias, em indivíduos com baixos níveis de VD (Kankova e cols., 1991), assim como, pode-se notar uma diminuição de reação de hipersensibilidade do tipo tardia (Yang e cols., 1993).

A relação entre níveis séricos de VD e a ocorrência de doenças infecciosas e autoimunes tem sido descrita. Dados na literatura demonstraram que indivíduos com

falência renal crônica apresentam resposta imune mediada por células deficientes, possivelmente devido à diminuição dos níveis de VD no soro em paciente com falência renal hemodialisados ou não (Selroos e cols., 1973). Alguns autores relataram que a VD possui efeito terapêutico e que pode restaurar a imunidade mediada por células (Tabata e cols., 1986).

DeLuca & Cantorna (2001), usaram o modelo de transplante de coração em camundongos para observar os efeitos da VD na rejeição a transplantes e foi possível observar que após 27 dias do transplante o processo de rejeição estava completo. Contudo, camundongos transplantados que receberam VD, foram protegidos por 100 dias. Esses resultados em modelo animal ilustram claramente que a imunidade mediada por células T pode ser regulada pela administração de VD exógena. Por outro lado, a carência de VD na dieta aumenta a incidência e severidade de doenças autoimunes, pontuando uma importante ação regulatória desse hormônio. A ação da VD como imunossupressora da imunidade mediada por células, parece ser específica não interferindo com a habilidade de camundongos na sua defesa contra infecções oportunistas. Camundongos tratados com VD foram testados em relação à susceptibilidade às duas doenças infecciosas (DeLuca & Cantorna, 2001). Uma delas foi infecção por *Candida albicans*, comumente encontrada em pacientes transplantados; a outra foi herpes viral. Em ambas, não houve interferência da VD no curso da doença, simultaneamente doses idênticas de VD foram totalmente efetivas na prevenção da rejeição de transplantes. Por isso, a VD vem sendo classificada como imunossupressora seletiva, mas atualmente esse mecanismo permanece incompreendido (DeLuca & Cantorna, 2001).

DeLuca e colaboradores, (2001), ao estudarem EAE, relataram a incidência dessa patologia em 100% dos camundongos alimentados com uma dieta contendo 8,7% de cálcio, porém sem VD. Contudo, quando esses animais foram suplementados diariamente com 1,25(OH)₂D, conseguiram prevenir o aparecimento das lesões características da doença. Devido aos resultados positivos nos estudos de EAE, DeLuca e colaboradores, (2001), decidiram estudar outras doenças autoimunes. Assim sendo, o grupo estudou artrite auto-imune e observou que a administração de VD preveniu as lesões. Anteriormente, em 1992, Lemire e colaboradores, descreveram em camundongos uma atenuação dessa patologia, pela suplementação com VD, três vezes por semana. Da mesma forma, Cantorna e colaboradores (2000), investigaram o possível tratamento ou prevenção de doença

inflamatória intestinal (IBD) pela VD. A deficiência de VD acelera o aparecimento dos sintomas e aumenta a severidade para IBD em camundongos *knock-out* para IL-10, que desenvolvem os sintomas entre 6 a 8 semanas, sendo possível observar que a suplementação com VD, previne o desenvolvimento da doença.

Uma outra desordem auto-imune estudada é a diabetes do tipo 1. DeLuca e colaboradores (2001) reportaram que em camundongos com deficiência de VD, houve uma aceleração do aparecimento, bem como, o aumento da patologia. Todavia, uma posterior administração de VD em doses diárias protegeu parcialmente os camundongos do desenvolvimento de diabetes, mesmo assim, as taxas de incidência foram na ordem de 30 a 40%. No entanto, o aumento na dosagem diária de VD mostrou-se capaz de prevenir o aparecimento de diabetes.

Contudo, a VD não possui efeitos benéficos para todas as doenças. No caso da asma, foram realizados experimentos em camundongos *knock-out* para VDR, camundongos selvagens, e camundongos selvagens tratados com VD, em todos os animais a asma foi induzida. Foi possível observar que camundongos selvagens desenvolveram asma e que camundongos *knock-out* para VDR não conseguiram montar uma resposta tipo Th2 nos pulmões. O tratamento de camundongos selvagens com VD não teve efeito sobre a severidade da doença. A ausência de sinalização de VD através do VDR protegeu esses animais do desenvolvimento da asma (Wittke e cols., 2004).

Dados na literatura apresentam controvérsia em relação à atuação da VD no sistema imune. Um outro grupo demonstrou que quando comparados resultados *in vitro* e clínicos foi possível observar uma discrepância em relação à função da VD no sistema imune: os metabólitos de VD possuem um efeito imunoinibitório *in vitro*, mas estimulatório *in vivo*. Esse fato pode ser explicado pelo excesso na concentração de VD utilizado nos experimentos (Yang e cols., 1993). Zarrabeitia e colaboradores, (1990), demonstraram que a adição de VD na concentração de (10^{-11} M) induziu a um pequeno, mas significativo aumento (11%) na proliferação de linfócitos de pacientes que fazem hemodiálise. Quando foi utilizada uma concentração elevada de VD (10^{-9} a 10^{-7} M) observou-se uma inibição de (60%) na mitose de células de pacientes que fazem hemodiálise e indivíduos saudáveis. Vale salientar que, elevadas concentrações de VD *in vitro* não são achadas *in vivo*, a não ser em situações de extrema toxicidade.

Esses resultados tornam aparente que a capacidade dessa vitamina em estimular ou inibir o sistema imune é dose dependente e por isso, sua concentração deve encontrar-se em equilíbrio acarretando um adequado funcionamento do sistema imune.

2.6 VITAMINA D E TUBERCULOSE

A possibilidade do envolvimento da VD na TB tem sido levantada há muito tempo. Em 1800, a terapia com VD na forma de óleo de fígado de bacalhau e exposição a luz solar eram usados para tratar pacientes com TB (Davies e cols., 1987). Antes da descoberta das drogas anti-micobacterianas a VD era usada para tratar pacientes com TB cutânea nos quais foram observados efeitos impressionantes (Dowling & Prosser-Thomas, 1946). O interesse no uso da VD declinou com o desenvolvimento de drogas anti-micobacterianas, mas nos últimos anos muitas evidências têm sido relatadas sobre a VD e a imunidade para TB (Bellamy, 2000). Dados descritos na literatura mostram que o sistema imune é diretamente influenciado pelo *status* nutricional do indivíduo, mais especificamente, a má nutrição afeta de maneira negativa a capacidade de estabelecer uma resposta imune adequada contra agentes infecciosos, acarretando em uma redução das imunidades celular e humoral (Chandra e cols, 1994). Todavia, ainda não se tem comprovação se é a deficiência de VD que precede o desenvolvimento da TB ou se a deficiência nutricional causada por esta doença leva a baixas concentrações de VD (Bellamy, 2000). Relatos na literatura descrevem uma probabilidade dez vezes maior de desenvolver TB em indivíduos com baixos níveis séricos de VD (Rook, 1988) em indivíduos vegetarianos restritos (Wilkinson et al., 2000), quando ambas populações são pouco expostas à luz solar. Assim, inúmeros estudos sugerem associação entre o metabolismo de VD e a imunidade para TB, dessa forma a deficiência de VD tem sido associada com a susceptibilidade e severidade da TB (Rockets e cols., 1998 ; Wilkinson e cols., 2000). Em modelos animais, a infecção com o *Mycobacterium bovis* produz aumento da concentração de 1,25(OH)₂D no

soro em gado. Por outro lado, o aumento da colonização nos pulmões e no tamanhos das lesões, pode ser observado em camundongos com deficiência de vitamina D (Waters e cols., 2004). De acordo com Zittermann (2003), a VD é viável em induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos, que por sua vez, representam a primeira linha de defesa inespecífica do sistema imune contra o *Mtb*. Esse hormônio aumenta a atividade das enzimas lisossomais dos macrófagos e ainda facilita a atividade citolítica pelo aumento da fagocitose (Zittermann, 2003). Esse efeito tardio se dá pelo aumento da expressão de receptores de superfície Fc (Boltz-Nitulescu e cols., 1995) e pelo aumento do *burst* respiratório (Cohen e cols., 1986). Macrófagos alveolares de pacientes com TB podem produzir grandes quantidades de 1,25(OH)₂D e a concentração desse metabólito nos granulomas pode ser suficiente para prevenir o crescimento bacteriano (Chandra, 2004). Segundo Crowle e colaboradores (1987), para haver uma proteção efetora da VD sobre monócitos e macrófagos infectados com o *M. tuberculosis*, é necessário uma concentração de 4 µg/ml *in vitro*, sendo considerada maior do que o encontrado normalmente na circulação *in vivo*, contudo esta mesma concentração de VD é encontrada nos granulomas. Assim sendo, esses achados conectam a VD e imunidade para a TB, sugerindo o papel da VD como um fator vital no controle da TB.

Concentrações séricas do hormônio calcitriol (VD ativa) em pacientes com TB são mais baixas do que em indivíduos controles saudáveis em população da Inglaterra (Chan, 1999), no entanto não diferem estatisticamente entre a população da Indonésia (Grange e cols., 1985). Contudo, foi demonstrado que pacientes com TB podem produzir calcitriol bem como outros metabólitos nos sítios de atividade da doença (Rook, 1988). Essa produção espontânea de metabólitos de VD pelos tecidos granulomatosos podem ter consequências clínicas favoráveis ou desfavoráveis (Rook, 1988). Assim, a produção de calcitriol ou outros metabólitos podem ter efeitos deletérios, mediados pela rede endócrina. Dados na literatura demonstram controvérsias em relação a produção de VD pelos pacientes com TB. Alguns trabalhos relatam, uma hipercalcemia com níveis aumentados de calcitriol em alguns pacientes com TB, contrastando com os estudos realizados por Chan (1999), em pacientes anéfricos (Cadranel e cols., 1988). Essa produção em alta escala dos metabólitos de VD nos pacientes com TB podem contribuir para caquexia e febre (Rook e cols., 1987). Por outro lado, assim como os metabólitos de VD podem ser

deletérios para os pacientes com TB pelas razões descritas acima, em outras circunstâncias, várias linhas de estudos sugerem que o calcitriol (1,25(OH)₂D) operando dentro da mesma rede de hormônios autócrina/parácrina, pode ser benéfica para esses pacientes com TB. Logo, foi demonstrado que células obtidas dos sítios granulomatosos convertem 25(OH)₂D em 1,25(OH)₂D, bem como expressam o VDR (Biyoudi-Vouenze e cols., 1991). Um dado importante é que estudos realizados na década de 90 por Cadranel e colaboradores (1990) sugeriram que a produção extrarenal de calcitriol ocorria na maioria dos pacientes com TB, mas infelizmente não se teve nenhuma informação comparando a produção dos metabolitos de VD e a apresentação clínica desses pacientes com TB nessa época. No entanto, outros estudos demonstraram que em contraste com os indivíduos controles, os pacientes com TB foram capazes de sintetizar calcitriol e que os macrófagos podem contribuir muitas vezes para essa produção (Cadranel e cols., 1994), quando estimulados por sinais do sistema imune, como o IFN- γ (Hewinson e cols., 2003). Estudos com células T de lavado bronco alveolar de pacientes com TB, demonstraram a capacidade dessas células em converter 25(OH)₂D em 1,25(OH)₂D e expressar mais receptores de VD do que indivíduos controle (Davies e cols., 1985; Cadranel e cols., 1990). Assim sendo, os linfócitos T são predominantes fontes do metabolismo de VD nos pulmões dos pacientes com TB. Sabe-se também que o calcitriol regula negativamente a transcrição de TACO (“tryptophan-aspartate containing coat gene”), que está envolvido na sobrevivência intracelular do *Mtb* em macrófagos humanos (Anand & Kaul, 2003).

Recentemente Martineau e colaboradores (2007a), relataram suplementação de VD em pacientes com TB juntamente com o uso de medicação específica. Contudo, existe controvérsia em relação a dosagem adequada de VD, administrada nos pacientes. Doses elevadas possivelmente são responsáveis pela hipercalcemia apresentada em alguns casos (Abbasi e cols., 1979). Alguns trabalhos relatam que as drogas anti-tuberculostáticas diminuem o nível sérico de VD circulante (forma ativa e inativa) em indivíduos saudáveis, porém não explicam a baixa incidência de hipercalcemia em pacientes que não começaram a antibiótico-terapia (Brodie e cols., 1982). Nesta mesma linha, a suplementação com uma dose de 2,5 mg de VD intensifica significativamente a capacidade micobactericida *in vitro* de macrófagos de contatos de pacientes com TB, sem contudo apresentarem hipercalcemia e sem afetar a produção de IFN- γ (Martineau e cols., 2007b). De modo interessante, foi

observado que a VD é capaz de reduzir a transcrição e secreção de IFN- γ , IL-12 e TNF em células mononucleares e macrófagos infectados, indicando assim que a proteção relacionada a suplementação da VD pode não estar associada somente a estas citocinas. Neste caso, a VD inibiria o crescimento intracelular do *Mtb* através do aumento da produção de NO₂ e do peptídeo LL-37, capaz de reduzir em 75,7% o crescimento do *Mtb in vitro* (Martineau e cols., 2007c).

Assim, muitas evidências sugerem que o calcitriol está envolvido na imunidade para a TB e que a deficiência deste hormônio pode estar relacionada à susceptibilidade para TB (Bellamy & Hill, 1998), devido ao mal funcionamento de monócitos e macrófagos (Chan, 2000).

Sabe-se que a VD exerce sua função no sistema imune via VDR e que muitas das suas atividades biológicas são mediadas pela alta ou baixa afinidade com este receptor celular. O complexo ligante/receptor regula a transcrição de genes que estão envolvidos no ciclo celular, apoptose e diferenciação (Simboli-Campbell e cols., 1996). O VDR pertence à superfamília dos receptores ativados por ligação, que é responsável por mediar as ações biológicas da VD. Os metabólitos ativos da VD contribuem para a manutenção da homeostase do cálcio, ligando-se ao VDR e alterando a transcrição dos genes alvo. O VDR é um receptor de hormônio nuclear, localizado no cromossoma 12 na região q12-14(13q1). A expressão de VDR ocorre em uma variedade de organismos e já foi clonado em galinha, camundongos, ratos e principalmente em humanos (Kamei e cols., 1995). Variações genéticas no VDR têm sido associadas com concentrações circulantes no soro de 25(OH)D, bem como com a densidade mineral óssea (Riggs e cols., 1997). Se a deficiência de VD é um fator de risco para a TB, conseqüentemente variações no gene *VDR* podem estar associados com a TB (Bellamy e cols., 1999).

Roth e colaboradores (2004) encontraram uma distribuição para os genótipos de VDR, entre pacientes com TB pulmonar e controles peruanos, de 90% de homocigotos (**TT**) e 10% de heterocigotos (**Tt**) sem encontrar sequer um homocigoto (**tt**) em cada grupo. Seus achados foram correlacionados com o tempo decorrido entre o início do tratamento e a negativação da cultura de escarro indicando que os pacientes com genótipo Tt (gene *Taq1*) apresentaram resultado negativo mais rapidamente, próximo a 30 dias, do que aqueles com genótipo TT.

Em estudos preliminares realizados em nosso laboratório, analisando polimorfismo no gene *Taq1* do VDR, foi observado a presença de homocigotos (TT)

em 40% dos pacientes e 32% dos indivíduos controles; heterozigotos (Tt) em 50% dos pacientes e 44% dos indivíduos controles; homozigotos (tt) em 10% dos pacientes e 24% dos indivíduos controles. Esses resultados são compatíveis com aqueles encontrados por Bellamy e colaboradores (1999), ao estudarem a população africana encontrando sub-representação do genótipo tt entre os pacientes de TB e Wilkinson e colaboradores (2000), ao estudarem indianos. Contrariando esses resultados, Selvaraj e colaboradores (2000), em estudo com a população indiana encontraram indícios da associação do genótipo tt à susceptibilidade à TB em mulheres.

No Rio de Janeiro, a população é reflexo da miscigenação de diversas raças que colonizaram o Brasil (índios, africanos, portugueses, italianos, espanhóis, holandeses, alemães, poloneses, ucranianos e judeus) o que possivelmente explicaria a prevalência de heterozigotos em 50% dos pacientes e 44% dos controles. Uma análise com maior número amostral está sendo realizada pra confirmar estes dados.

Hipotetizamos, com base em resultados preliminares, discordantes dos relatos anteriormente publicados - onde a TB (em indivíduos de origem Indiana e Africana) estava associada à avitaminose D e a presença do alelo tt no VDR - que na população estudada os baixos níveis séricos de vitamina D e o polimorfismo no VDR não estão associados ao aparecimento da TB. Outros fatores podem estar relacionados, como os mecanismos de transporte da vitamina, realizados através da proteína de transporte da VD (VDBP).

2.7 PROTEÍNA DE TRANSPORTE DE VITAMINA D

A forma inativa (25(OH)D) e a forma ativa (1,25(OH)2D) da VD são moléculas lipossolúveis. Devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso do plasma, os compostos da VD são transportados na circulação ligados a VDBP, conhecida anteriormente como - Gc-globulina ou componente grupo específico do soro. A

VDBP é uma proteína multifuncional, com 458 aminoácidos de aproximadamente 50 a 58 kDa (Lauridsen e cols., 2004). A proteína VDBP é expressa pelo gene *DBP*, membro de um cluster multigênico que inclui a albumina, α -fetoproteína e α -albumina/afamina e está localizado no cromossoma 4q11-13 e contém três polimorfismos: um polimorfismo no (TAAA)N no intron 8; e dois no exon 11, levando a substituição de T→G que troca o ácido aspártico pelo ácido glutâmico no códon 416; e uma substituição de C→G no códon 420 que muda a treonina por lisina (Braun e cols., 1993; Apud Pani 2002).

Os dois polimorfismos no exon 11 são codificados por um dos três alelos co-dominantes do gene *DBP*: Gc*1F(fast), Gc*1S(slow) e Gc*2 (Ito et al, 2004). Desta forma, a combinação desses 3 alelos dá origem a 6 fenótipos comumente encontrados na população (F/S, F/F, S/S, S/2, F/2, 2/2). Os outros três fenótipos são considerados raros, todavia foi possível encontrar um destes fenótipos entre o nosso grupo de pacientes (S/2-Glu/Thr + Glu/Lys) (Ye e cols.,2001). Por se tratar somente de um único indivíduo, este foi excluído da análise estatística.

Em conseqüência das variações nos polimorfismos de *DBP* ocorre uma diferença na afinidade pela 1,25(OH)2D sérica (Pani et al, 2002). Assim, Lauridsen e colaboradores (2005) reportaram que a afinidade de ligação entre a 1,25(OH)2D sérica e a VDBP ocorre dependente dos diferentes tipos de fenótipos, ou seja, os portadores do grupo de fenótipo Gc1-1 (1S/1S, 1F/1F, 1F/1S) possuem elevada afinidade de ligação com o calcitriol, enquanto que o grupo Gc1-2 (2/1S, 2/1F) possui afinidade de ligação intermediária e o grupo Gc2-2 (2/2) baixa afinidade de ligação. Esta afinidade se relaciona a posterior disponibilidade de VDBP e os níveis séricos da forma ativa e inativa de vitamina D. No entanto a concentração plasmática de 1,25(OH)2D e o índice de 1,25(OH)2D (dividido pela VDBP plasmática) não diferiu entre os grupos estudados (Lauridsen e col., 2005). Contudo, a concentração de VDBP no plasma difere entre os grupos, assim o grupo de fenótipo Gc1-1 (1S/1S, 1F/1F, 1F/1S) possui elevada concentração, enquanto que o grupo Gc1-2 (2/1S, 2/1F) possui concentração intermediária e o grupo Gc2-2 (2/2) baixa concentração (Lauridsen e col., 2001) (resumido na Tabela 2).

Tabela 2: Afinidade de ligação entre os grupos de fenótipos de VDBP e Vitamina D e concentração plasmática de VDBP

	GRUPOS						
	Gc 2/2		Gc 1/1			Gc 1/2	
AFINIDADE	↑		↑ ↑ ↑			↑ ↑	
FENÓTIPOS	2/2		S/S	F/F	F/S	2/S	2/F
GENOTIPOS	Hs Hs		hS hS				
PROTEÍNAS	Asp/Lys + Asp/Lys		Glu/Thr + Glu/Thr	Asp/Thr + Asp/Thr	Asp/Thr + Glu/Thr	Glu/Thr + Asp/Lys	Asp/Thr + Glu/Lys Asp/Lys
NÍVEL DE VDBP	↑		↑ ↑ ↑			↑ ↑	

Afinidade de ligação dos grupos de Gc-globulin e a VD (↑=pouca afinidade, ↑↑=média afinidade de ligação, ↑↑↑=elevada afinidade de ligação).

A síntese da VDBP ocorre no fígado dependente de estrogênio e aumenta durante a gravidez e em terapias com estrogênio (Speeckaert e cols., 2006). Em indivíduos saudáveis a sua concentração no plasma varia de 300 a 600 µg/mL (Cooke e cols., 1986). E é encontrada circulando no plasma em concentrações 20 vezes maior do que o total de metabólitos circulantes de VD. Apenas 5% do total da VDBP existente no plasma humano normal estão ocupados com os metabólitos de VD. E mesmo estando presente em menor quantidade, a proteína VDBP possui a capacidade de ligação com a 25(OH)D de 88% de afinidade (alta afinidade) e com a 1,25(OH)2D de 85% de afinidade (menor afinidade), podendo influenciar na farmacocinética desta vitamina (White & Cooke, 2000). Assim sendo, pode-se preconizar que em condições fisiológicas normais, praticamente todos os compostos de VD estão ligados à VDBP. Elevadas quantidades de VD são consideradas tóxicas para o organismo, por isso, a VDBP tem um papel importante na defesa contra intoxicação resultante do excesso de VD, capturando os metabólitos livres de VD no

soro (Bouillon e cols., 1981). A VDBP livre e aquela ligada aos metabólitos de vitamina D são filtradas através dos glomérulos e reabsorvidas pelo receptor endocítico chamado megalin nas células dos túbulos proximais (White & Cooke, 2000). A endocitose da VDBP ligada à VD é mediada pelo receptor megalin e parece ser a principal rota para preservar os níveis de circulação de 25(OH)D e 1,25(OH)2D pela 1- α hidroxilase renal. De fato, em camundongos *knock-out* para megalin observa-se um aumento na excreção urinária de 25(OH)D e VDBP, além de uma séria deficiência de VD com comprometimento ósseo (White & Cooke, 2000). Esse estudo indica que na ausência de VDBP, ocorre uma captura mais rápida dos metabólitos de 25(OH)D, assim como a sua ativação em 1,25(OH)2D que ocorre por uma outra via independente do receptor megalin. Porém, camundongos *Knock-out* para o receptor megalin, não sobreviveram, não sendo possível a mensuração dos níveis de 25(OH)D e 1,25(OH)2D. Esses dados suportam a idéia de que, apesar de existir uma outra rota para a possível ativação de 25(OH)D em 1,25(OH)2D, a rota através do receptor megalin deve ser a principal para ativação da VD (White & Cooke, 2000).

Segundo Haddad e colaboradores (1981), em experimentos realizados em animais a VDBP ou VDBP ligada a VD, encontra-se amplamente distribuída em vários órgãos como os rins, fígado, musculatura esquelética, coração, pulmão, intestino e ossos. Podendo ser encontrada em fluidos corporais como fluido do epitélio alveolar (Metcalf e cols., 1991), cerebrospinal, fluído seminal, saliva e leite materno (Kew e cols., 1995; White e cols., 2000). Em estudos realizados por Daiger e colaboradores (1975), foi observada a presença de VDBP na superfície de várias células, incluindo neutrófilos, fibroblastos, monócitos, células B e T, citotrofoblastos, espermatozóides humanos e células musculares. Contudo doenças do fígado, síndrome nefrítica e má nutrição são caracterizadas por baixas concentrações de VDBP devido à diminuição da síntese ou por perda excessiva da proteína (Haddad e cols., 1992).

Além de transportar a VD, a proteína VDBP realiza ativação de macrófagos a partir de Gc-MAF ("macrophage-activating factor"). Inúmeros estudos utilizando modelos *in vitro* identificaram a VDBP como uma molécula ativadora através de um sistema onde a VDBP presente no soro é convertida em Gc-MAF. A VDBP é deglicolizada pelas enzimas β -galactosidase e sialidase presentes nos linfócitos B e

T, respectivamente (Yamamoto e Naraparaju, 1996). A rápida produção de Gc-MAF durante a inflamação, por modificação de VDBP, induz a ativação de macrófagos em doenças infecciosas e inflamatórias (Swamy, 1997), bem como, a morte celular em macrófagos por ativação das caspases (Gumireddy e cols., 2003). Além disso, estimula a atividade dos osteoclastos e consequente reabsorção óssea (Swamy, 2001),

O papel da VDBP como ativador de macrófagos é independente da habilidade de ligação com a VD (Yamamoto & Naraparaju, 1996). Vale salientar que o macrófago ativado desenvolve a capacidade de realizar tarefas específicas tais como quimiotaxia, fagocitose, lise de parasitas intracelulares, bem como a destruição de células tumorais (White & Cooke, 2000). Assim, experimentos com camundongos *Knock-out* para o gene *DBP* demonstram que estes animais apresentaram baixa na resposta imune contra infecções bacterianas (White e cols., 2000) e deficiência nos níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH)2D, demonstrando a importância dessa proteína para a manutenção dos estoques dos metabólitos de VD no soro, contribuindo para modular suas bioviabilidades, ativações e atuações nos órgãos, tecidos e células alvos (Safadi e cols., 1999). O efeito da proteína VDBP como ativador de macrófago é intensificado pela ação do IFN- γ , induzindo a produção de 25(OH)D1 α -hidroxilase nos macrófagos pulmonares e da medula óssea que podem então converter 25(OH)D em 1,25(OH)2D (Reichel e cols., 1987). Em estudos realizados por Roodman e colaboradores (1985), macrófagos teciduais ativados de pacientes com doenças granulomatosas, tal como TB, podem gerar grandes quantidades de 1,25(OH)2D por esta rede a partir de Gc-MAF, estabelecendo um quadro de hipercalcemia sistêmica. Em adição, a 1,25(OH)2D é um potente agente diferenciador de monócitos e esse efeito pode ser atribuído a habilidade em estimular a secreção do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (Roodman e cols., 1985). Além disso, dados na literatura descrevem que a VDBP intensifica a atividade quimiotática de peptídeos derivados do fator 5 do complemento (C5 ou C desArg) em neutrófilos, recrutando essas células para o sítio da infecção (Kew, 1995; DiMartino & Kew, 1999).

Um outro dado importante, é que a VDBP em conjunto com a proteína gelsolin atuam no sistema de limpeza da actina extracelular. A actina é secretada no meio extracelular após lise e as condições iônicas do microambiente promovem a polimerização de g-actina (forma monomérica) para f-actina (forma filamentar)

(White & Cooke, 2000). O papel da VDBP nesse sistema é se ligar a g-actina e prevenir futura polimerização, evitando dessa forma, danos na microvasculatura com formação de trombos (Otterbein e cols., 2002). Foi possível observar que em pacientes politraumatizados, a concentração total de VDBP livre de actina, parece ser significativamente aumentada em sobreviventes do que em não sobreviventes (Schiodt e cols., 2001). Assim sendo, a concentração de VDBP pode ser considerada como um marcador de prognóstico em situações de severo dano aos órgãos, como falência hepática fulminante (Schiodt e cols., 1996), overdose a drogas (Schiodt e cols., 2001), múltiplo trauma e falência múltipla de órgãos (Dahl e cols., 2003)

Estudos realizados por Dahl e cols.,(2003), demonstraram que reduzidas concentrações de VDBP estão associadas com um pobre prognóstico para a sobrevivência e um aumento no risco de desenvolvimento de Síndrome de Disfunção Múltipla de órgãos (MODS) na sepsi. Essa associação é similar ao tradicional fator de risco clínico, bem como, o número e tipo de órgãos traumatizados. Inicialmente a diminuição na circulação de VDBP ligada a actina foi associada com o desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada e Síndrome de *stress* respiratório agudo (ARDS) (Mounzer e cols., 1999). Os níveis de circulação de VDBP em pacientes que desenvolveram severa disfunção múltipla de órgãos foram menores do que em pacientes que não desenvolveram (Mounzer e cols., 1999). Segundo Yamamoto e colaboradores., (1997), as concentrações de VDBP permanecem significativamente menores em pacientes que desenvolveram falência respiratória e sepsi depois de injúria traumática, comparado a pacientes que não desenvolveram essas complicações. Esses dados sugerem que a secreção de actina e depleção de proteínas do sistema extracelular de limpeza de actina são associados e podem contribuir em parte para as complicações de sepsi e disfunção múltipla de órgãos, particularmente, falência respiratória e trombocitopenia.

Como citado acima, a VDBP é um precursor do fator de ativação de macrófagos (Gc-MAF), levando a um aumento na atividade tumoricida de macrófagos, contra uma grande variedade de câncer (Kanda e cols., 2002). Estudos, demonstraram que o Gc-MAF tem atividade anti-angiogênica em células endoteliais independente do tecido de origem e parece ser mediada pelo receptor CD36. Como a angiogênese é essencial para a formação do tumor sólido, o CD36 pode ser um potencial alvo na terapia anti-angiogênica (Kanda e cols., 2002). Segundo Koga e

colaboradores (1999), camundongos em estágio avançado de câncer não são hábeis para ativar macrófagos, porque células neoplásicas possuem a capacidade de inativar VDBP. Assim, essas células secretam a enzima endoglicosidase que pode deglicolisar a VDBP em pacientes portadores de neoplasia (Yamamoto & Naraparaju, 1996).

Estudos realizados por Kisker e cols., (2003), demonstraram que o Gc-MAF inibe o crescimento de células neoplásicas no pâncreas em camundongos imunossuprimidos. A análise desses tumores indicou que, além da presença de um grande número de macrófagos, o tumor tem a capilaridade reduzida e aumento do número de células apoptóticas (Kiskerecols.,2003).

Adicionalmente, o Gc-MAF também participa da quimiotaxia de células fagocíticas (Yamamoto e cols., 1991; Kew e cols., 1988). Essas funções sugerem o papel dessa proteína na resposta crônica inflamatória nos pulmões. Dessa forma, Ishii e cols (2001) e pouco depois, Ito e cols (2004), compararam os polimorfismos no gene *DBP* entre os pacientes fumantes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) e o grupo de fumantes saudáveis e demonstraram aumento na proporção do fenótipo **F/F** (32%) entre os pacientes quando comparados com os fumantes sem DPOC (17%). Esses resultados sugerem que pode existir uma significativa associação entre os polimorfismos do gene *DBP* e o risco de desenvolver essa patologia na população japonesa.

Outros grupos estudam os polimorfismos do gene *DBP* e sua possível associação a doenças auto-imunes. Dessa forma, Fournier e colaboradores.,(1990), realizaram experimentos em modelo animal e demonstraram que a VD pode prevenir tireoidite auto-imune. Em humanos, os níveis séricos de VD foram significativamente menores em casos de hipertiroidismo auto-imune do que em hipertiroidismo não auto-imune (Tokuda e cols., 1990). A VD diminui a expressão de moléculas de MHC II nas células da tireoide (Tokuda e cols., 1990) e inibe a proliferação dos linfócitos, assim como a secreção de citocinas inflamatórias (Thomasset, 1994).

Existe uma clara associação entre os alelos do gene *DBP* e a afinidade de ligação a VD, assim vários autores têm estudado estes polimorfismos em diversas doenças. Pani e colaboradores (2002) não evidenciaram associação entre os polimorfismos para o gene *DBP* no exon 11 em relação à tireoidite de *Hashimoto* e

doença de *Graves* em população caucasiana, porém demonstraram associação entre o polimorfismo do gene *DBP* no intron 8 e a doença de *Graves*. Da mesma forma, Niino e colaboradores., (2002) não demonstraram associação entre os polimorfismos do gene *DBP* no exon 11 com a ocorrência de esclerose múltipla em população japonesa.

Yamamoto e colaboradores (1997) descreveram que macrófagos do sangue periférico de 33 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, ativados por Gc-MAF, foram capazes de sintetizar superóxido dismutase. No entanto, a atividade precursora de VDBP foi perdida ou reduzida nesses pacientes. Esse fato pode ser explicado pela deglicosilação de VDBP, pela α -N-acetylgalactosaminidase, encontrada no plasma desses pacientes. Sabe-se que a VDBP glicosilada não pode ser convertida em Gc-MAF, resultando em um mecanismo defeituoso de ativação de macrófagos, levando a incapacidade em eliminar os complexos imunes, tendo assim um importante papel na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico.

Uma função importante do *DBP* é a endocitose celular e subsequente metabolismo intracelular da VD. Porém, variações nos aminoácidos da VDBP, devido à ocorrência de polimorfismos no gene *DBP*, podem afetar a viabilidade da forma ativa da VD em células β no pâncreas, prejudicando a secreção de insulina (Baier e cols., 1998). Dados na literatura relacionam esses polimorfismos a diabetes mellitus do tipo 2 (T2DM), em população da Polinésia e Japão (Kirk e cols., 1981; Hirai e cols., 1998). Todavia, estudos com populações caucasianas falharam em demonstrar associação dos polimorfismos do gene *DBP* com T2DM (Klupa e cols., 1999; Ye e cols., 2001; Malecki e cols., 2002). Da mesma forma, na população branca americana de origem europeia, não houve associação dos polimorfismos do gene *DBP* com diabetes do tipo 1 (Klupa e cols., 1999).

A VDBP tem um importante papel em relação ao sistema imune e os polimorfismos no gene *DBP* que expressam essa proteína, têm sido intensamente estudados na perspectiva de uma possível associação com a susceptibilidade com várias patologias, bem como, o seu uso em futuras terapias.

Não há relatos ao nosso conhecimento, em relação aos polimorfismos no gene *DBP* e sua associação com TB ou outras doenças infecciosas. Contudo, dois artigos relatam na década de 80, a inexistência de associação entre a Gc-globulina e a TB na população indiana (Papiha e cols., 1983), e árabe (Bahr e cols., 1989), quando

comparados os resultados entre pacientes e controles saudáveis, não houve diferença fenotípica significativa com relação a TB.

A partir dos dados descritos acima muitas questões a cerca das funções da proteína VDBP permanecem não compreendidas. No entanto é possível verificar que o gene *DPB* é de suma importância para a homeostasia do sistema imune. Assim, a determinação de uma possível associação entre o gene *DBP*, a produção da proteína VDBP e afinidade de ligação com a vitamina D, podem contribuir para a determinação de uma possível susceptibilidade à algumas doenças infecciosas, incluindo a TB.

Sabe-se que a infecção pelo *M. tuberculosis* pode estar entre as doenças comumente associadas à desnutrição (Kulkarni, 1994; Harbige, 1996) e assim, diretamente relacionada à deficiência de vitamina D e as possíveis variações gênicas no *DBP*.

3 OBJETIVOS

- Descrever as variações do polimorfismo do gene *DBP* em indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.
- Verificar possíveis associações dos polimorfismos no gene *DBP* e seus fenótipos à susceptibilidade à doença, através de análise de população sadia, exposta ao *Mycobacterium tuberculosis*.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA:

Foram incluídos pacientes com TB pulmonar ativa e indivíduos controles saudáveis, através do projeto “Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a TB - relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adoecimento e estagiamento clínico”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz e da Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (anexos A e B).

No grupo controle foram incluídos profissionais do Centro de Referência em Tuberculose do IPEC e do Posto de Saúde Alberto Borgerth (Posto de Madureira) e/ou contactantes (aqueles que permanecerem no mesmo domicílio que o caso índice por mais de 4 horas diárias por pelo menos 4 semanas anteriores a inclusão do paciente) e estão envolvidos com o caso índice. Os pacientes com TB receberam acompanhamento médico e tratamento adequado, inclusive antituberculostáticos, além de receber antiretrovirais específicos caso fossem HIV-1 positivos, contudo esses indivíduos foram excluídos do estudo. O tratamento e as medicações utilizadas foram distribuídos para os pacientes gratuitamente. Foi aplicado um questionário clínico-epidemiológico (anexo C). Após serem esclarecidos sobre os objetivos do projeto os indivíduos que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo D e E).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

4.2.1 Pacientes com TB

Foram incluídos, no período de 2000 a 2006, todos os pacientes com TB pulmonar que apresentaram baciloscopia e/ou cultura positiva(s) e/ou diagnóstico clínico determinado pelos achados radiológicos e resposta terapêutica, a partir de uma amostra de escarro colhida espontaneamente (em relação aos pacientes do PAM Madureira) e/ou por indução e/ou por lavado broncoalveolar (em relação aos pacientes do IPEC/Fiocruz) e que seguiram os seguintes critérios:

- Aceitarem participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, depois de ter todas as dúvidas retiradas pelos pesquisadores envolvidos;
- Tiveram amostra biológica coletada até o sétimo dia após o início do tratamento;
- Apresentavam idade entre 18 e 70 anos;
- Realizaram os exames diagnósticos para TB e HIV.
- Estar sendo acompanhado clinicamente na Unidade Médica do IPEC ou no Posto de Saúde Alberto Borgerth.

4.2.2 Indivíduos controle

Foram incluídos no grupo controle, indivíduos **saudáveis** sem sintomatologia para a TB, selecionados entre profissionais de saúde do IPEC/Fiocruz e do Posto de Saúde Alberto Borgerth, entre aqueles que tinham contato com pacientes portadores

de TB e/ou material biológico proveniente de tais pacientes durante suas atividades laborais diárias e contactantes dos casos índices (alta exposição) e indivíduos que não tinham história prévia de contato com casos índice de TB (baixa exposição). Estes indivíduos foram por sua vez subdivididos de acordo com a reatividade ao PPD cutâneo, em indivíduos PPD positivos e PPD negativos.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

4.3.1 Pacientes com TB

Foram excluídos indivíduos nas seguintes condições:

- Mulheres grávidas no momento da inclusão no estudo;
- Pessoas com idade inferior a 18 ou superior a 70 anos;
- Pacientes cujo diagnóstico para TB não tenha sido confirmado por exames;
- Rejeição quanto à realização da sorologia para HIV e/ou testes diagnósticos para tuberculose;
- Portadores de outras patologias, relatadas durante o inquérito, incluindo portadores do vírus HIV

4.3.2 Indivíduos controles

- Mulheres grávidas no momento da inclusão no estudo;
- Pessoas com idade inferior a 18 ou superior a 70 anos;
- Rejeição quanto à realização da sorologia para HIV
- Portadores de outras patologias, relatadas durante o inquérito, incluindo portadores do vírus HIV

4.4 EXAMES COMPLEMENTARES

4.4.1 Teste do PPD (derivado de proteína purificada)

Os pacientes e indivíduos controles realizaram o teste cutâneo ao PPD (0,1 ml – RT23, Serum Institute, Copenhagem, Alemanha) anteriormente à inclusão no estudo, através da aplicação via intradérmica de 0,1 mL, equivalente a 2 UT, da tuberculina. A leitura foi realizada 72 horas após a aplicação e os resultados expressos em milímetros após a avaliação do maior diâmetro da endureção pelo tato (método da palpação), utilizando uma régua flexível ou pelo método de marcação por caneta. Valores iguais e maiores que 10 mm foram considerados positivos.

4.4.2 Sorologia para o HIV 1 e 2:

A sorologia para o HIV foi realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico do Serviço de Imunologia do IPEC/Fiocruz através de ensaio de imunofluorescência indireta (IFI, BioManguinhos, Fiocruz), teste de fluorescência imunoenzimática (Elfa, Biolab - Sistema Vidas (BioMérieux) e quimioluminescência (Sanofi Pasteur), sob responsabilidade de Ingebourg Georg.

4.4.3 Diagnóstico da Tuberculose

Para o diagnóstico da TB foi adotada a rotina do Centro de Referência Municipal em TB do IPEC/FIOCRUZ que é composta de diagnóstico bacteriológico

associado à reação de hipersensibilidade cutânea e exame clínico. Os mesmos procedimentos foram utilizados para o diagnóstico no Posto de Saúde Alberto Borgerth. Os pacientes com suspeita clínica de TB foram submetidos à realização de:

a) telerradiografia de tórax;

b) isolamento, identificação e teste de sensibilidade às drogas. A cada paciente foi solicitada a coleta de três amostras consecutivas de escarro e este material foi encaminhado ao Serviço de Bacteriologia do IPEC/Fiocruz e ao laboratório do PAM de Irajá para ser processado através da baciloscopia pelo método de Ziehl Neelsen e cultura. Os pacientes cuja baciloscopia apresentasse resultado negativo, foram efetivamente incluídos no estudo após o resultado positivo da cultura.

4.5 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE VDBP

4.5.1 Obtenção de amostras biológicas.

Foi obtida uma única amostra de sangue no momento da inclusão dos pacientes com TB e os indivíduos controles. Cinco mL de sangue total em EDTA (Vacuntainer) foi alíquotado e armazenado em freezer -20°C até o momento do uso, para extração do DNA genômico. Cinco mL de soro foi armazenado em freezer -70°C para a sorologia para HIV-1.

4.5.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizados 200 μL da alíquota do sangue total em EDTA previamente descongelado. Utilizou-se o QIAmp DNA blood

mini kit (Qiagen). A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico seguiu o protocolo descrito pelo fabricante: 20 μL da proteinase Qiagen foi adicionada a um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*, previamente rotulado com o número da amostra. Adicionou-se a estes tubos, 200 μL de cada amostra de sangue, seguido de 200 μL do tampão AL, do próprio Kit. Os tubos foram homogenizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi incubada a 56°C por 10 minutos e centrifugada a 10.000 rotações por minuto (rpm), (rapidamente, ou seja, logo que atingia a rotação de 10 000 rpm a operação era interrompida), o processo foi repetido por 3 vezes, para remover os possíveis resíduos da tampa. Adicionou-se 200 μL de etanol (96 a 100%, marca Merck) e homogenizado em vortex por 15 segundos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm, rapidamente, como anteriormente descrito, para remover os possíveis resíduos da tampa. A seguir, a amostra foi cuidadosamente transferida para a coluna QIAmp e a mesma centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi novamente transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit), o filtrado descartado. Adicionou-se 500 μL do tampão AW1 (incluso no kit) e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500 μL do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna QIAmp foi transferida para um *ependorf* de 1,5 mL (sem tampa) e o filtrado descartado. Adicionou-se 100 μL do tampão AE (do Kit), incubando-se a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e então centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi descartada. O filtrado foi transferido para um *ependorf* de 1,5 mL e o DNA genômico foi acondicionado em freezer - 70 °C.

Dez μL de cada amostra de DNA foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, em tampão TBE 1X, a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA genômico foi corado em uma solução de Brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP).

4.5.3 Amplificação por PCR-RFLP

Os polimorfismos localizados no gene DBP, resultante da atividade da endonuclease Hae III e Sty I foram identificados através da utilização dos primers específicos, seguindo protocolo de Ishii e colaboradores (2001), como descrito a seguir:

Primer I: 5' TAA TGA GCA AAT GAA AGA AG 3'

Primer II: 5' AAT CAC AGT AAA GAG GAG GT 3'

O fragmento alvo do DNA genômico foi amplificado por PCR utilizando-se termociclador GeneAmp 9700 Applied Biosystem de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório. Seguindo o protocolo de Ye e colaboradores (2001), adaptando-se o volume final para 30 μ L.

Para cada amostra foi preparado um *mix* contendo: 3 μ L (2 μ M) de primer DBP1 (FW) (Invitrogen[®] - 10mM), 3 μ L (2 μ M) de primer DBP2 (RE) (Invitrogen[®] - 10mM), 0,6 μ L (400 μ M) de dNTP(Applied Biosystem[®]), 0,6 μ L de MgCl₂ (25 mM, Kit Hot Star Qiagen), 4 μ L de Tampão (10X, Kit Hot Star Qiagen), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L, Kit Hot Star Qiagen), 16,3 μ L de H₂O MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 28 μ L sendo adicionado 2 μ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 30 μ L. A PCR foi realizada no Termociclador (Applied Biosystems). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (15 minutos), 35 ciclos de 94°C (45 segundos), 51°C (45 segundos) e 72°C (45 segundos) seguidos por 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2 %, utilizando TBE 1X. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA foi corado em uma solução de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta em transluminador.

As imagens foram capturadas usando um sistema de captura de imagem com máquina fotográfica digital (Kodak, modelo EDAS 290).

4.5.4 Digestão com enzimas de restrição.

Para determinar o genótipo de cada indivíduo, no *locus* estudado, foi realizada digestão por enzima de restrição específica. Assim, o produto do PCR amplificado para o loci do *DBP* foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *Hae III* e *Sty I* (BioLabs, Inglaterra). O protocolo adotado foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada amostra foi preparado um mix da enzima de restrição *Hae III* contendo: 7,6 μL de água pura (MilliQ), 0,4 μL (4 U) *Hae III* (Biolabs) e 2 μL de Tampão (10 X, Biolabs). O mesmo foi feito para a enzima de restrição *Sty I*, para cada amostra foi preparado um mix da enzima de restrição *Sty I* contendo: 0,2 μL BSA (100 X, Biolabs), 7,4 μL de água pura (MilliQ), 0,4 μL (4 U) *Sty I* (Biolabs), 2 μL de Tampão 10X(Biolabs). A digestão com as enzimas de restrição *Hae III* e *Sty I* foi feita da seguinte maneira: 10 μl do mix da enzima específica foram adicionados a 10 μl do produto da PCR para *DBP* para cada amostra e em seguida foram incubadas a 37°C por 4 horas para *Hae III* e 37°C para *Sty I* por 16 horas em banho-maria.

4.5.5 Eletroforese em gel de agarose

Após a incubação os produtos da digestão foram confirmados através da corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5 %, utilizando TBE 1X. O produto da digestão foi corado com brometo de etídeo (0,3 μl) em corrente de 90 volts em tempo médio de duas horas, utilizando 9 μl do produto da digestão +1 μl de corante (solução de azul de bromo fenol, Invitrogen) . Como marcador de peso molecular foi usado 3 μl do peso molecular padrão (100bp) + 7 μl de água + 2 μl de corante.

Ao término da corrida eletroforética o produto da digestão pode ser visualizado

sob luz ultravioleta. Tanto para a enzima de restrição *Hae III* quanto para a *Sty I* a visualização do padrão de bandas do polimorfismo no gel de agarose a 1,5% ocorre de acordo com a figura 1. A banda única indica a ausência de corte com as enzimas de restrição (1) apresentando peso molecular de 483 bp (pares de bases) para os homozigotos **HH** e **SS**. As três bandas (2) geradas com a enzima de restrição (*Hae III* e *Sty I*), representam os heterozigotos **Hh** e **Ss**. Essas bandas apresentam os pesos moleculares de 483 bp, 297 bp e 186 bp para o corte com *Hae III* e 483 bp, 305 bp e 178 bp para o corte com *Sty I*. As duas bandas (3) geradas com a enzima de restrição (*Hae III* e *Sty I*), representam os homozigotos **hh** e **ss**. Essas bandas apresentam os pesos moleculares de 297 bp e 186 bp para o corte com *Hae III* e 305 bp e 178 bp para o corte com *Sty I*.

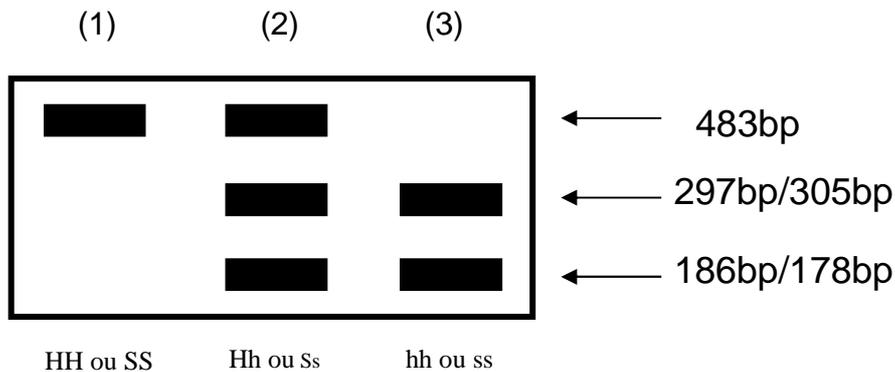


Figura 1: Esquema da eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, mostrando os genótipos do loci DBP tanto para o corte com a enzima de restrição *HaeIII* ou *StyI*.

A combinação dos resultados obtidos da digestão da enzima de restrição *Hae III* e *Sty I* gera 6 fenótipos distintos comumente encontrados na população: **F/F**, **F/2**, **S/S**, **2/2**, **F/S** e **2/S**, como pode ser visto na figura 2.

As imagens foram capturadas usando um sistema de captura de imagem com máquina fotográfica digital (Kodak, modelo EDAS 290).

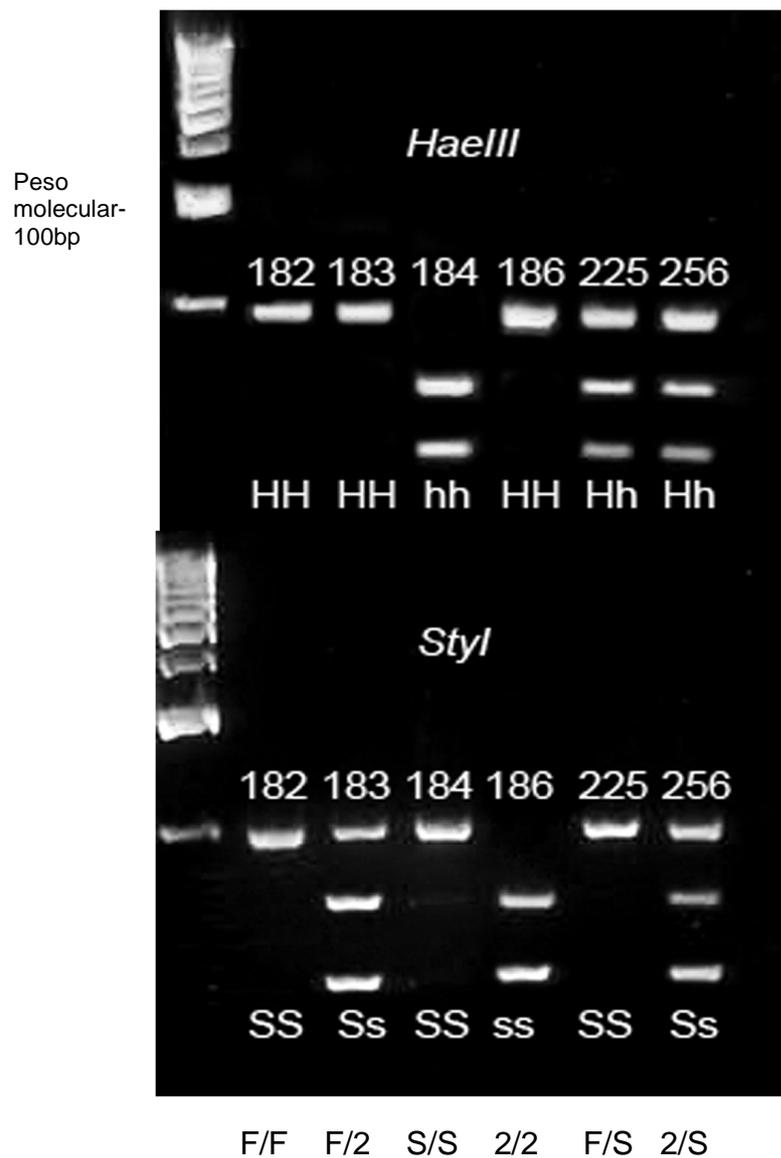


Figura 2: Análise fenotípica deduzida após caracterização dos genótipos identificados nos codons 416 (*Hae III*) e 420 (*Sty I*) em indivíduos do grupo controle.

Tabela 3: Dedução do fenótipo para o gene *DBP* a partir da associação dos resultados da digestão com as enzimas de restrição *Hae III* e *Sty I*.

GENÓTIPO <i>Hae III</i>	GENÓTIPO <i>Sty I</i>	FENÓTIPO
HH Asp/Asp	SS Thr/Thr	F/F Asp/Thr + Asp/Thr
HH Asp/Asp	Ss Thr/Lys	F/2 Asp/Thr + Asp/Lys
HH Asp/Asp	ss Lys/Lys	2/2 Asp/Lys + Asp/Lys
Hh Asp/Glu	SS Thr/Thr	F/S Asp/Thr + Glu/Thr
Hh Asp/Glu	Ss Thr/Lys	2/S Asp/Thr + Glu/Lys Glu/Thr + Asp/Lys
Hh Asp/Glu	ss Lys/Lys	Raro Asp/Lys + Glu/Lys
hh Glu/Glu	SS Thr/Thr	S/S Glu/Thr + Glu/Thr
hh Glu/Glu	Ss Thr/Lys	Raro Glu/Thr + Glu/Lys
hh Glu/Glu	ss Lys/Lys	Raro Glu/Lys + Glu/Lys

1F (Asp/Thr; 1S Glu/Thr; 2 Asp/Lys) (Ye et al., 2001)

4.5.6 Análise estatística dos resultados

Foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical package for the social Science) versão 11.0 para a determinação exata das freqüências dos genótipos, alelos e fenótipos dos polimorfismos realizados neste estudo. O programa Epi-Info foi utilizada para análises de χ^2 em tabelas 2 x 2.

A casuística foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberge.

Como não dispomos de dados publicados em relação à freqüência dos genótipos e alelos do *DBP* na população brasileira, ou mesmo em indivíduos com TB, nossos dados serão comparados à freqüência descrita em outras populações analisadas para tais polimorfismos em doença auto-imunes e infecciosas.

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Durante o período de abril de 2004 a janeiro de 2007 foram incluídos 255 voluntários, sendo 112 provenientes da coorte do Centro de Referência para Tuberculose do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz e 143 voluntários do Posto de Saúde Alberto Borgheth, da Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Destes, 160 indivíduos apresentaram tuberculose pulmonar ativa e 95 eram indivíduos controle. Dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa a média de idade foi de $37,3 \pm 12,8$ anos variando de 18 a 68 anos, sendo 100 (62,5%) homens e 60 (37,5%) mulheres. Quando separamos esses pacientes em relação ao sexo podemos observar que a média de idade dos pacientes femininos foi de $35,2 \pm 12,2$ anos variando de 18 a 68 anos e os do sexo masculino a média de idade foi de $38,4 \pm 13,1$ anos variando de 19 a 66 anos. Dos 160 pacientes com tuberculose pulmonar ativa 67 (41,9%) realizaram o PPD cutâneo que variou de 0 a 35 mm de diâmetro ($15,6 \pm 0,4$ mm), desses 14 (20,9%) foram não-reatores (0 a 4 mm), 4 (5,9%) foram reatores fracos (5 a 9 mm) e 49 (73,2%) foram reatores fortes (10 mm ou mais) e 93 (58,1%) pacientes não realizaram o teste (Tabela 4). Não observamos diferença estatisticamente significativa entre a idade ($p=0,44$) dos pacientes com TB pulmonar em comparação ao sexo, contudo o teste cutâneo ao PPD mostrou ser maior nas mulheres ($16,9 \pm 8,8$ mm) do que nos homens ($14,4 \pm 11,7$ mm; $p=0,06$).

Este grupo, em relação à raça, apresentou 54 (33,8%) indivíduos brancos e 75 (46,8%) negros, contudo em 31 (19,4%) indivíduos não foi possível obter dados referentes à raça.

Os indivíduos do grupo controle apresentaram idade variando de 18 a 68 anos ($32,1 \pm 11,6$ anos), sendo 33 (34,7%) homens e 62 (65,3%) mulheres. Os indivíduos do sexo masculino tinham média de idade de $30,5 \pm 10,5$ anos variando de 18 a 58 anos e as mulheres tinham uma média de idade de $33,0 \pm 12,1$ anos variando de 18 a 68 anos. Dentre os 95 indivíduos controle 87 (91,6%) realizaram o PPD cutâneo que teve uma variação de 0 a 48 mm de diâmetro ($10,9 \pm 11,2$) desses indivíduos 33 (37,9%) foram não reatores, 9 (10,3%) foram reatores fracos e 45 (51,7%) foram reatores fortes (Tabela 4). Não observamos diferença estatisticamente significativa entre a idade ($p=0,06$) ou o teste cutâneo ao PPD entre mulheres ($10,9 \pm 11,3$ mm) e homens ($10,8 \pm 11,5$ mm; $p=0,52$). No grupo controle 53 (62,3%) indivíduos foram brancos e 32 (37,7%) negros, sendo que em 10 (10,5%) indivíduos não foi possível obter dados referentes à raça.

Os valores do PPD cutâneo não diferiram entre homens do grupo controle ($10,8 \pm 11,5$ mm) e os pacientes com tuberculose ($14,4 \pm 11,7$ mm), contudo nas mulheres houve uma tendência à presença de PPD de maior valor nas pacientes com TB ($16,9 \pm 8,8$ mm) do que nas voluntárias sadias ($10,9 \pm 11,2$ mm; $p=0,52$).

Os indivíduos controle apresentaram uma proporção maior de indivíduos da raça branca em relação aos pacientes com tuberculose ($p=0,003$)(Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição de sexo, idade, raça e teste cutâneo PPD em indivíduos com TB pulmonar e controles.

	TB PULMONAR n= 160 (%)		CONTROLES n=95 (%)	
SEXO				
Masculino	100 (62,5)		33 (34,7)	
Feminino	60 (37,5)		62 (65,3)	
IDADE (anos)				
	37,3 ± 12,8		32,1 ± 11,6	
Masculino	38,4 ± 13,1		30,5 ± 10,5	
Feminino	35,2 ± 12,2		33,0 ± 12,1	
RAÇA				
Branca	54 (41,8)		53 (62,3) (p= 0,003*)	
Não branca	75 (58,2)		32 (37,7)	
PPD (mm)				
	(n=67)	15,6 ±10,4	(n=87)	11,4 ± 11,6
Masculino	(n=33)	14,4 ± 11,7	(n=30)	10,8 ± 11,5 (p= 0,52)
Feminino	(n=34)	16,9 ± 8,8	(n=57)	10,9 ± 11,3

Os dados apresentados de idade e PPD estão em média aritmética ± desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05^*$.

Para análise, o grupo controle foi dividido em dois subgrupos. Indivíduos saudáveis, sem sintomatologia de TB que ao serem incluídos apresentaram histórico de contatos prévios com pacientes de tuberculose por período superior a 4 semanas, sendo estes contatos realizados através de familiares com TB, ou por conversão ao teste cutâneo ao PPD, ou serem profissionais da área de saúde do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz ou Posto de Saúde Alberto Borgheth, da Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Este subgrupo foi denominado como contactantes (CT) (alta exposição ao *M. tuberculosis*). No segundo subgrupo, incluem-se indivíduos saudáveis, sem sintomatologia de TB que ao serem incluídos não apresentaram histórico de contatos prévios com pacientes de tuberculose independente do resultado ao teste cutâneo ao PPD no momento de inclusão. Este grupo foi denominado somente como sadios (baixa exposição ao *M. tuberculosis*).

Dentre os 52 CT a média de idade foi de $32,5 \pm 12,9$ anos variando de 18 a 68 anos, sendo 18 (34,6%) homens e 34 (65,3%) mulheres. Quando separamos esses indivíduos em relação ao sexo podemos observar que a média de idade do sexo feminino foi de $33,4 \pm 13,9$ anos variando de 18 a 68 anos e os do sexo masculino a média de idade foi de $30,6 \pm 10,8$ anos variando de 20 a 58 anos. Dos 52 CT 43 (82,7%) realizaram o PPD cutâneo que variou de 4 a 34 mm de diâmetro ($10,2 \pm 10,9$ mm), desses 15 (34,9%) foram não-reatores (0 a 4mm), 8 (18,6%) reatores fracos (5 a 10 mm) e 20 (46,5%) reatores fortes (10 mm ou mais) e 9 (20,9%) não realizaram o teste (Tabela 5).

Os indivíduos sadios apresentaram idade variando de 18 a 56 anos ($31,8 \pm 9,9$ anos), sendo 15 (34,8%) homens e 28 (65,1%) mulheres. Os indivíduos do sexo masculino tinham uma média de idade de $30,3 \pm 10,4$ anos variando de 18 a 54 anos e as mulheres tinham uma média de idade de $32,5 \pm 9,6$ anos variando de 20 a 56 anos. Dentre os 43 indivíduos sadios 36 (83,7%) realizaram o PPD cutâneo que teve uma variação de 0 a 48 mm de diâmetro ($12,8 \pm 12,3$), desses indivíduos 14 (38,8%) foram não reatores, 1 (2,8%) foi reator fraco, 21 (58,3%) foram reatores fortes e 7 (19,4%) não realizaram o teste (Tabela 5). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos do grupo controle, quando estes foram

subdivididos em indivíduos CT e sadios, em relação à idade, sexo, reatividade ao PPD cutâneo e raça ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição de sexo, idade, raça e teste cutâneo PPD em indivíduos com TB pulmonar e indivíduos controle (contatos e sadios).

	TB PULMONAR		CONTROLES			
	n= 160 (%)		CONTATOS (52)		SADIOS (43)	
SEXO						
Masculino	100 (62,5)		18 (34,6)		15 (34,8)	
Feminino	60 (37,5)		34 (65,3)		28 (65,1)	
IDADE (anos)						
	37,3 ± 12,8		32,5 ± 12,9		31,8 ± 9,9	
Masculino	38,4 ± 13,1		30,6 ± 10,8		30,3 ± 10,4	
Feminino	35,2 ± 12,2		33,4 ± 13,9		32,5 ± 9,6	
RAÇA						
	n=129		n=49		n=29	
Branca	54 (33,8)		27 (55,1)		22 (75,8)	
Negra	75 (46,9)		22 (44,9)		7 (24,1)	
PPD (mm)						
	(n=67)	15,6 ± 10,2	(n=43)	10,2 ± 10,9	(n=36)	12,8 ± 12,3
Masculino	(n=33)	14,4 ± 11,7 (p= 0,06)	(n=15)	7,5 ± 8,9 (p=0,13)	(n=13)	15,2 ± 13,4 (p= 0,90)
Feminino	(n=34)	16,9 ± 8,8	(n=28)	11,6 ± 11,7	(n=23)	11,3 ± 11,7

Os dados apresentados de idade e PPD estão em média aritmética ± desvio padrão. Foi considerado significante $p < 0,05^*$.

5.2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA O GENE *DBP*:

5.2.1 Distribuição genotípica

Para a análise do polimorfismo para o gene *DBP*, 255 amostras foram submetidas ao PCR-RFLP, seguindo-se o protocolo descrito por Ye e colaboradores (2001). Para o codon 416, após o corte com a enzima de restrição *Hae III*, foi possível observar que em relação aos pacientes com tuberculose, 70 (43,7%), 66 (41,3%) e 24 (15,0%) foram portadores dos genótipos denominados como **HH**, **Hh** e **hh**. Em relação ao grupo controle observamos que 31 (32,6%), 45 (47,4%) e 19 (20,0%) foram respectivamente homozigotos (**HH**) heterozigotos (**Hh**) e homozigotos (**hh**).

Quando os genótipos foram comparados entre os dois grupos, não observamos diferença estatística ($\rho=0,08$; **HH**; $\rho=0,34$; **Hh** e $\rho=0,30$, **hh**) (Tabela 6). Contudo, quando o grupo controle foi subdividido em dois subgrupos, CT e sadios observamos que 17 dos 52 (32,7%) e 14 dos 43 (32,6%) indivíduos foram homozigotos (**HH**); 28 (53,8%) e 17 (39,5%) heterozigotos (**Hh**) e 7 (13,5%) e 12 (27,9%) homozigotos (**hh**), respectivamente. Esses resultados não foram estatisticamente significativos ($0,08 \leq \rho \leq 0,99$). Quando comparamos os genótipos dos pacientes com TB pulmonar e CT não observamos diferença estatisticamente significativa ($0,11 \leq \rho \leq 0,78$) (Tabela 6). Todavia, ao compararmos os genótipos dos pacientes com TB pulmonar e indivíduos sadios foi possível observar diferença estatisticamente significativa com relação ao genótipo **hh** ($\rho=0,049$, OR=0,46 e IC=0,19-1,09) (Tabela 6).

O polimorfismo na posição 420 foi determinado pelo corte com a enzima de restrição *Sty I*. Assim, foi possível observar que nos pacientes com tuberculose 102 (63,8%), 47 (29,4%) e 11 (6,8%) foram portadores dos genótipos denominados como **SS**, **Ss** e **ss**. Em relação ao grupo controle observamos que 49 (51,6%), 37 (38,9%) e 9 (9,5%) foram respectivamente homozigotos (**SS**) heterozigotos (**Ss**) e homozigotos (**ss**) não sendo estes resultados estatisticamente significativos ($0,08 \leq p \leq 0,30$) (Tabela 6). Quando subdividimos o grupo controle em CT e sadios observamos que entre os CT 26 (50,0%), 22 (42,3%) e 4 (7,7%) foram respectivamente homozigotos (**SS**), heterozigotos (**Ss**) e homozigotos (**ss**). Em relação aos sadios, observamos que 23 (53,5%), 15 (34,9%) e 5 (11,6 %) foram homozigotos (**SS**), heterozigotos (**Ss**) e homozigotos (**ss**), respectivamete, não sendo esse resultado estatisticamente significativo ($0,46 \leq p \leq 0,73$) (Tabela 6). Quando comparamos os genótipos dos pacientes com TB pulmonar e CT não foi possível observar significância estatística ao genótipo ($0,08 \leq p \leq 0,84$). Da mesma forma, ao compararmos os genótipos dos pacientes com TB pulmonar e indivíduos sadios não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os genótipos ($0,21 \leq p \leq 0,48$) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos genótipos para o gene *DBP* definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com tuberculose pulmonar e grupo controle (**A**), com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios (**B**), com tuberculose pulmonar e indivíduos contato (**C**) e entre indivíduos sadios e contato (**D**).

A		POLIMORFISMOS (n -%)					
		TB PULMONAR (160)		CONTROLES (95)		ρ	OR
<i>Haelll</i>	HH	70	43,3	31	32,6	0,08	1,61
	Hh	66	41,3	45	47,5	0,34	0,78
	hh	24	15,0	19	20,0	0,30	0,71
<i>Styl</i>	SS	102	63,8	49	52,0	0,06	1,65
	Ss	47	29,4	37	39,0	0,12	0,65
	ss	11	6,8	9	9,0	0,46	0,71
B		TB PULMONAR (160)		SADIO (43)		ρ	OR
<i>Haelll</i>	HH	70	43,3	14	32,6	0,18	1,61
	Hh	66	41,3	17	39,5	0,83	1,07
	hh	24	15,0	12	27,9	0,049	0,46
<i>Styl</i>	SS	102	63,8	23	53,5	0,21	1,53
	Ss	47	29,4	15	34,9	0,48	0,78
	ss	11	6,8	5	11,6	0,30	0,26
C		TB PULMONAR (160)		CONTATO (52)		ρ	OR
<i>Haelll</i>	HH	70	43,3	17	32,7	0,15	1,60
	Hh	66	41,3	28	53,8	0,11	0,60
	hh	24	15,0	7	13,5	0,78	1,13
<i>Styl</i>	SS	102	63,8	26	50,0	0,21	1,76
	Ss	47	29,4	22	42,3	0,08	0,57
	ss	11	6,8	4	7,7	0,84	0,89
D		CONTATO (52)		SADIO (43)		ρ	OR
<i>Haelll</i>	HH	70	43,3	14	32,6	0,99	1,01
	Hh	66	41,3	17	39,5	0,16	1,78
	Hh	24	15,0	12	27,9	0,08	0,40
<i>Styl</i>	SS	102	63,8	23	53,5	0,73	0,87
	Ss	47	29,4	15	34,9	0,46	1,37
	ss	11	6,8	5	11,6	0,51	0,63

Intervalo de confiança=95% ou 0,05. TB-tuberculose, OR- odd ratio

5.2.2 Freqüência alélica

A freqüência dos alelos **H** e **S** apresentaram maior freqüência em pacientes com TB pulmonar (64,4% e 78,4%, respectivamente) em relação ao grupo controle (55,8% e 71,5%) ($p=0,07$; OR=1,4; e $p=0,06$; OR=1,5; respectivamente). De maneira inversa à freqüência dos alelos recessivos (**h** e **s**) que foram mais encontrados nos indivíduos controle (44,2% e 28,9%) do que nos pacientes com TB (35,6% e 21,5%) ($p=0,07$; OR=0,7; $p=0,06$; OR=0,7 respectivamente), como demonstrado na Tabela 7. Quando comparamos a freqüência dos alelos **H** e **S** nos subgrupos CT (59,6% e 71,1%) e sadios (52,3% e 70,9%), ($p=0,31$; OR=1,3; e $p=0,97$; OR=1,0; respectivamente) ou dos alelos **h** e **s** entre CT (44,2% e 29%,) e sadios (47,7% e 29,1%) ($p=0,31$; OR=0,7 e $p=0,97$; OR=0,9; respectivamente) foi possível observar igualdade na freqüência destes alelos, sem observarmos diferença estatística significativa. Quando comparamos a freqüência dos alelos **H** e **S** entre pacientes com TB (64,4% e 78,4%) e sadios (52,3% e 70,9%) ($p=0,04$; OR=1,7 e IC=0,99-2,74; e $p=0,14$; OR=1,5; respectivamente) podemos observar diferença estatisticamente significativa no alelo **H**. Da mesma forma, ao analisar as freqüência dos alelos **h** (35,6% e 47,7%) e **s** (21,6% e 29,1%) ($p=0,04$; OR=0,6 e IC=0,37-1,01; e $p=0,14$; OR=0,7; respectivamente) foi possível observar diferença estatisticamente significativa no alelo **h** como demonstrado na Tabela 8. Quando comparamos a freqüência dos alelos **H** e **S** (59,6% e 71,1%) ($p=0,38$; OR=1,2; e $p=0,12$; OR=1,5; respectivamente) e **h** e **s** (40,4% e 28,9%) ($p=0,38$; OR=0,8; e $p=0,12$; OR=0,7; respectivamente) entre pacientes com TB e CT não foi possível observar diferença estatística significativa como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição dos alelos para o gene *DBP* definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com tuberculose pulmonar e grupo controle (**A**), com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios (**B**), com tuberculose pulmonar e indivíduos contato (**C**) e entre indivíduos sadios e contato (**D**).

A	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		CONTROLES (95)		ρ	OR
H	206	64,4	107	55,8	0,07	1,40
h	114	35,6	83	44,2	0,07	0,70
S	251	78,4	135	71,5	0,06	1,5
s	69	21,6	55	28,9	0,06	0,70

B	TB PULMONAR (160)		SADIO (43)		ρ	OR
	H	206	64,4	45	52,3	0,04
h	114	35,6	41	47,7	0,04	0,61
S	251	78,4	61	70,9	0,14	1,50
s	69	21,6	25	29,1	0,14	0,70

C	TB PULMONAR (160)		CONTATO (52)		ρ	OR
	H	206	64,4	62	59,6	0,38
h	114	35,6	42	40,4	0,38	0,80
S	251	78,4	74	71,1	0,12	1,50
s	69	21,6	30	28,9	0,12	0,70

D	CONTATO (52)		SADIO (43)		ρ	OR
	H	62	59,6	45	52,3	0,31
h	42	40,4	41	47,7	0,31	0,74
S	74	71,1	61	70,9	0,97	1,01
s	30	28,9	25	29,1	0,97	0,99

Intervalo de confiança=95% ou 0,05. TB-tuberculose, OR- odd ratio

5.2.3 Análise dos fenótipos obtidos após associação dos polimorfismos no gene *DBP* nas posições 416 e 420.

São possíveis a formação de 9 fenótipos distintos a partir da análise dos polimorfismos no gene *DBP* nas posições 416 e 420. Assim, após a associação dos resultados obtidos com a análise genotípica, como descrito por Ye e colaboradores (2001) e representado pela tabela de dedução descrita na sessão de Metodologia (Tabela 3), foi possível observar que dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa 36 (22,5%) apresentaram o fenótipo F/S (**HS/hS**), 43 (26,9%) F/F (**HS/HS**), 23 (14,5%) S/S (**hS/hS**), 29 (18,0%) S/2 (**HS/hs*** ou **Hs/hS**), 17 (10,6%) F/2 (**HS/Hs**), 11 (6,9%) para o fenótipo 2/2 (**Hs/Hs**) e 1 (0,6%) indivíduo apresentou o fenótipo raro (**hS/hs**), não incluído na análise estatística por se tratar somente de um único indivíduo. Em relação aos indivíduos controle podemos observar que 19 (20%) apresentaram o fenótipo F/S (**HS/hS**), 11 (11,6%) F/F (**HS/HS**), 20 (21%) S/S (**hS/hS**), 24 (25,3%) S/2 (**HS/hs*** ou **Hs/hS**), 12 (12,6%) F/2 (**HS/Hs**) e 9 (9,5%) 2/2 (**Hs/Hs**). A análise estatística mostra que não houve significância ($p=0,09$) quando pacientes e controles foram comparados. Contudo, quando os resultados dos fenótipos entre pacientes e indivíduos controles foram analisados separadamente foi possível observar diferença estatisticamente significativa em relação á presença do fenótipo F/F ($p=0,004$; OR=2,81e IC=1,32-6,21) (Tabela 8). Quando subdividimos o grupo controle em CT e sadios observamos que entre os CT, 13 (25,0%) apresentaram o fenótipo F/S (**HS/hS**), 7 (13,5%) F/F (**HS/HS**), 7(13,5%) S/S (**hS/hS**), 15(28,8%) S/2 (**HS/hs*** ou **Hs/hS**), 6 (11,5%) F/2 (**HS/Hs**) e 4 (7,7%) 2/2 (**Hs/Hs**). Em relação aos sadios, 6 (14,0%) apresentaram o fenótipo F/S (**HS/hS**), 4(9,4%) F/F (**HS/HS**), 13 (30,2%) S/S (**hS/hS**), 9 (20,8%) S/2 (**HS/hs*** ou **Hs/hS**), 6 (14,0%) F/2 (**HS/Hs**) e 5 (11,6%) 2/2 (**Hs/Hs**). Não foi encontrado entre os indivíduos CT e sadios fenótipos raros. Foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os CT e sadios em relação ao fenótipo S/S (**hS/hS**; $p=0,045$, OR=0,36 e IC=0,1-1,11). No entanto em relação aos outros fenótipos não houve diferença estatisticamente significativa ($0,18 \leq p \leq 0,72$). Quando comparamos os

fenótipos dos pacientes com TB pulmonar e o subgrupo CT podemos observar diferença estatisticamente significativa em relação à presença do fenótipo F/F (**HS/HS**; $p= 0,047$; OR=2,36 e IC=0,93-6,23). Porém, não observamos diferença estatisticamente significativa ao analisarmos os resultados dos outros fenótipos ($0,56 \leq p \leq 0,97$). Ao compararmos os fenótipos dos pacientes com TB pulmonar e saudáveis observamos que houve diferença estatisticamente significativa em relação aos fenótipos F/F (**HS/HS**, $p=0,01$ e OR=3,58) e S/S (**hS/hS**, $p=0,01$ e OR=0,4). Contudo, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os outros fenótipos ($0,30 \leq p \leq 0,67$) (Tabela 8). .

Tabela 8: Distribuição dos fenótipos para o gene *DBP* definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com tuberculose pulmonar e grupo controle (A), com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios (B), com tuberculose pulmonar e indivíduos contato (C) e entre indivíduos sadios e contato (D).

A	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		CONTROLES (95)		ρ	OR
F/S	36	22,5	19	20,0	0,04	1,16
F/F	43	26,9	11	11,6	0,004	2,81
S/S	23	14,4	20	21,0	0,17	0,63
S/2	29	18,0	24	25,3	0,17	0,65
F/2	17	10,6	12	12,6	0,63	0,82
2/2	11	6,9	9	9,5	0,46	0,71
raro	1	0,6	0	0	-	-

B	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		SADIO (43)		ρ	OR
F/S	36	22,5	6	14,0	0,21	1,79
F/F	43	26,9	4	9,4	0,01	3,58
S/S	23	14,4	13	30,2	0,01	0,40
S/2	29	18,0	9	20,8	0,67	0,84
F/2	17	10,6	6	14,0	0,54	0,73
2/2	11	6,9	5	11,6	0,30	0,56
raro	1	0,6	0	0	-	-

C	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		CONTATO (52)		ρ	OR
F/S	36	22,5	13	25,0	0,71	0,87
F/F	43	26,9	7	13,5	0,047	2,36
S/S	23	14,4	7	13,5	0,87	1,08
S/2	29	18,0	15	28,8	0,97	0,55
F/2	17	10,6	6	11,5	0,85	0,91
2/2	11	6,9	4	7,7	0,84	0,89
raro	1	0,6	0	0	-	-

D	POLIMORFISMOS (n - %)					
	CONTATO (52)		SADIO (43)		ρ	OR
F/S	13	25,0	6	14,0	0,18	2,06
F/F	7	13,5	4	9,4	0,53	1,52
S/S	7	13,5	13	30,2	0,045	0,36
S/2	15	28,8	9	20,8	0,40	1,53
F/2	6	11,5	6	14,0	0,72	0,80
2/2	4	7,7	5	11,6	0,51	0,63
raro	0	0	0	0	-	-

Intervalo de confiança=95% ou 0,05. TB-tuberculose, OR- odd ratio

5.2.4 Análise dos haplótipos para o gene DBP observados em pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos controle.

As variantes F, S e 2 são definidas pela presença dos haplótipos de ácido aspártico-treonina (*Asp-Thr*), ácido glutâmico-treonina (*Glu-Thr*) e ácido aspártico-lisina (*Asp-Lys*) respectivamente. A Tabela 3 descrita na sessão de Metodologia descreve a dedução para os haplótipos de VDBP, como descrita por Ye e cols. 2001. Os pares de haplótipos foram diretamente deduzidos a partir dos genótipos quando estes foram homozigotos para os dois loci ou heterozigotos para um dos locus. Contudo, para os indivíduos heterozigotos (Hs/hS) nos dois loci a dedução é desconhecida (*Asp-Thr* e *Glu-Lys* ou *Glu-Thr* e *Asp-Lys*).

A distribuição do haplótipo *Asp-Lys* ocorreu em 21,32% pacientes com TB pulmonar e em 28,42% dos indivíduos controles ($p=0,70$). A distribuição do haplótipo *Asp-Thr* ocorreu em 43,57% pacientes com TB pulmonar e 27,89% dos indivíduos controle ($p=0,0004$), sendo estatisticamente significativo. Em relação ao haplótipo *Glu-Lys*, foi observada a ocorrência em 0,31% dos pacientes com TB e não houve ocorrência desse haplótipo entre os indivíduos controle, contudo esse haplótipo não foi incluído na análise estatística. Quanto ao haplótipo *Glu-Thr*, este foi observado em 34,80% dos pacientes com TB pulmonar ativa e 43,69% indivíduos do grupo controle ($p=0,046$, $OR=0,7$ e $IC=0,47-1,01$), sendo estatisticamente significativo (Tabela 9). Quando subdividimos o grupo controle em CT e sadios observamos que a distribuição do haplótipo *Asp-Lys* ocorreu em 29 (27,88%) CT e em 25 (29,06%) indivíduos sadios ($p=0,85$). A distribuição do haplótipo *Asp-Thr* ocorreu em 33 (31,73%) CT e 20 (23,25%) indivíduos sadios ($p=0,60$). Em relação ao haplótipo *Glu-Lys*, não foi observada a ocorrência em CT ou sadios. Quanto ao haplótipo *Glu-Thr*, este foi observado em 42 (40,38%) CT e 41 (47,67%) indivíduos sadios ($p=0,03$), sendo estatisticamente significativa (Tabela 10). Quando comparamos os pacientes com TB pulmonar e CT observamos que a distribuição do haplótipo *Asp-Lys* ocorreu em 68 (21,31%) pacientes com TB pulmonar e em 29 (27,88%) CT ($p=0,17$). A distribuição do haplótipo *Asp-Thr* ocorreu em 139 (43,57%) pacientes com TB e 33 (31,73%) CT

($p=0,03$), sendo estatisticamente significativo. Em relação ao haplótipo Glu-Lys, não foi observada ocorrência nos CT e 1(31%) paciente com TB pulmonar. Quanto ao haplótipo Glu-Thr, este foi observado em 42 (40,38%) CT e 111 (35,10%) pacientes com TB pulmonar ($p=0,30$). Não houve assim, diferença entre a ocorrência dos haplótipos nos pacientes com TB pulmonar e CT (Tabela 9). Quando comparamos os pacientes com TB pulmonar e sadios observamos que a distribuição do haplótipo Asp-Lys ocorreu em 68 (21,31%) pacientes com TB pulmonar e em 25 (29,06%) sadios ($p=0,13$). A distribuição do haplótipo Asp-Thr ocorreu em 139 (43,57%) pacientes com TB e 20 (23,25%) sadios ($p=0,0006$, OR=2,60 e IC=1,43-4,58), sendo estatisticamente significativo. Em relação ao haplótipo Glu-Lys, não foi observada ocorrência nos sadios e 1(0,31%) paciente com TB pulmonar ($p=0,60$), contudo esse haplótipo não participou da análise estatística. Quanto ao haplótipo Glu-Thr, este foi observado em 41 (47,67%) sadios e 111 (34,806%) pacientes com TB pulmonar ($p=0,03$), sendo estatisticamente significante (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição dos haplótipos para o gene *DBP* definidos pelas variações nos códons 416 e 420 em pacientes com tuberculose pulmonar e grupo controle (**A**), com tuberculose pulmonar e indivíduos sadios (**B**), com tuberculose pulmonar e indivíduos contato (**C**) e entre indivíduos sadios e contato (**D**).

A	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		CONTROLES (95)		ρ	OR
Asp-Lys (HS)	68	21,32	54	28,42	0,07	0,07
Asp-Thr (Hs)	139	43,57	53	27,89	0,0004	2,00
Glu-Lys (hS)	1	0,31	0	0	-	-
Glu-Thr (hs)	111	34,80	83	43,69	0,046	0,70

B	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		SADIO (43)		ρ	OR
Asp-Lys (HS)	68	21,32	25	29,06	0,13	0,07
Asp-Thr (Hs)	139	43,57	20	23,25	0,0006	2,60
Glu-Lys (hS)	1	0,31	0	0	-	-
Glu-Thr (hs)	111	34,80	41	47,67	0,03	0,60

C	POLIMORFISMOS (n - %)					
	TB PULMONAR (160)		CONTATO (52)		ρ	OR
Asp-Lys (HS)	68	21,32	29	27,88	0,17	0,70
Asp-Thr (Hs)	139	43,57	33	31,73	0,03	1,66
Glu-Lys (hS)	1	0,31	0	0	-	-
Glu-Thr (hs)	111	34,80	42	40,38	0,30	0,60

D	POLIMORFISMOS (n - %)					
	CONTATO (52)		SADIO (43)		ρ	OR
Asp-Lys (HS)	29	27,88	25	29,06	0,85	0,94
Asp-Thr (Hs)	33	31,73	20	23,25	0,60	1,20
Glu-Lys (hS)	0	0	0	0	-	-
Glu-Thr (hs)	42	40,38	41	47,67	0,31	0,74

Intervalo de confiança=95% ou 0,05. TB-tuberculose, OR- odd ratio

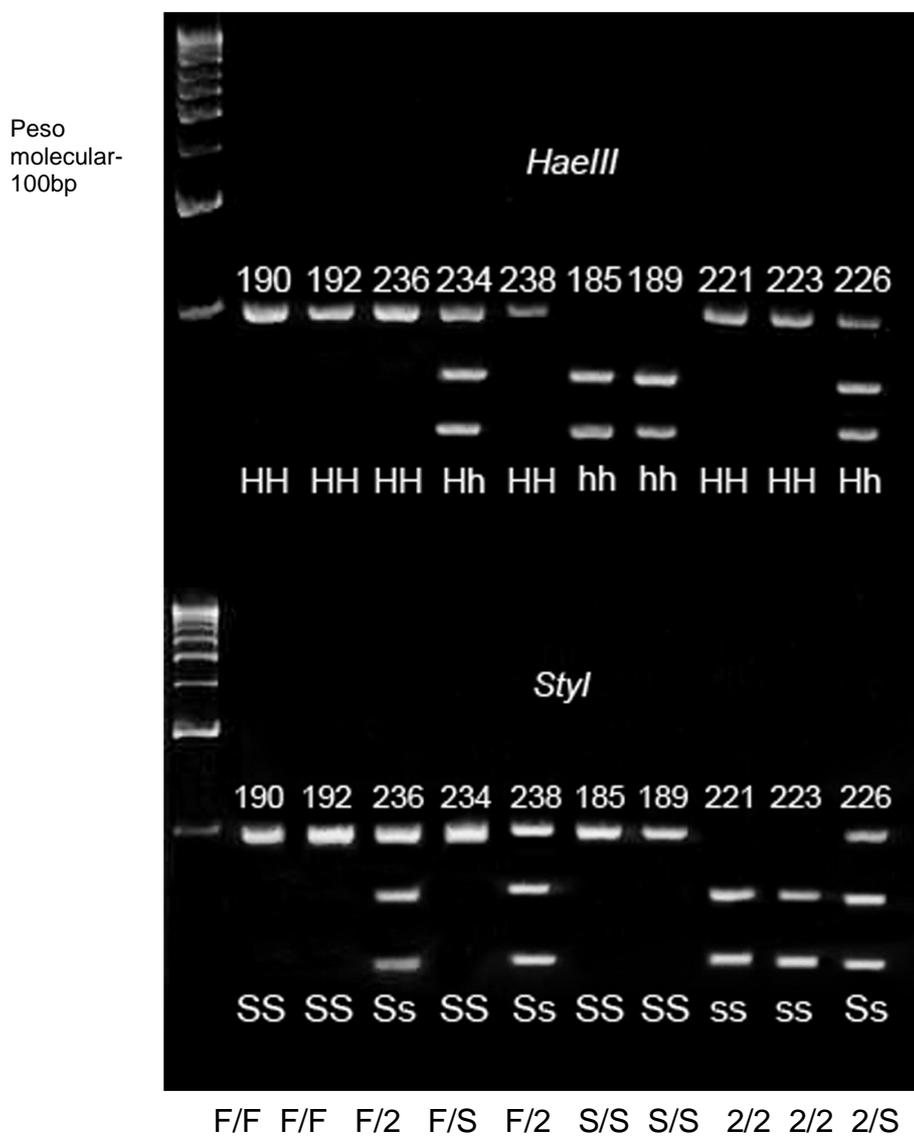


Figura 3: Exemplifica a associação dos genótipos obtidos pelos cortes com as enzimas de restrição Hae III e Sty I e dedução dos fenótipos em pacientes com TB pulmonar.

6 DISCUSSÃO

A TB é uma desordem multifatorial, no qual o ambiente interage diretamente com os fatores relacionados ao hospedeiro, contribuindo para a totalidade de fenótipos. Muitos fatores possuem um papel principal na susceptibilidade individual para o *Mtb*. Desta forma, entender o balanço individual entre o grau de exposição e fatores genéticos de susceptibilidade inerentes à infecção, bem como os respectivos efeitos relacionados ao ambiente e ao hospedeiro no desenvolvimento da TB, poderia ter fortes implicações no controle e possível prevenção da TB (Lienhart, 2001).

O estudo da genômica humana ampliou nosso entendimento nas diferenças interindividuais e interpopulacionais e principalmente em auxiliar as correlações com a susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas, tais como a TB. Da mesma forma que a descrição do genoma da cepa H37Rv do *Mtb* (Cole e cols., 1998) possibilitou a identificação de genes ligados as vias metabólicas e de fatores de virulência deste microrganismo. Assim, diversos resultados nestas áreas podem direcionar pesquisas que auxiliem na identificação de redes imunológicas, moleculares e bioquímicas envolvidas na instalação e manutenção da relação parasita-hospedeiro e com isso traçar metas para o desenvolvimento de novas vacinas, métodos diagnósticos, bem como, agentes quimioterápicos e imunoterápicos contra a TB (Davies & Grange, 2001)

Somente 10% da população infectada pelo *Mtb* desenvolverão a TB e sabe-se que fatores genéticos bem como fatores ambientais estão intimamente envolvidos neste processo (Bellamy, 2003). Desta forma, determinar o *background* genético individual a partir de uma população seria de suma importância para o entendimento da TB (Bellamy, 2003). Múltiplos fatores do

hospedeiro determinam o prognóstico da infecção pelo *Mtb* e são controlados geneticamente. (Davies & Grange, 2001).

O presente estudo teve por objetivo identificar polimorfismos no gene *DBP*, com vistas a buscar uma possível correlação entre a resistência ou susceptibilidade a esta importante doença que vem acometendo milhões de pessoas em todo mundo e que possui uma imunopatologia extremamente complexa.

Entre as pessoas expostas à TB, o risco de se tornar infectado é determinado primariamente pela combinação de três fatores: a infectividade das pessoas consideradas transmissoras, do grau de exposição à doença e do grau de susceptibilidade da pessoa a esta infecção. A infectividade dos transmissores vai depender da freqüência de tosse, da quantidade dos bacilos no escarro (Shaw & Wynn-Williams, 1954; Loudon & Spohn, 1969) e do grau de virulência do bacilo infectante (Valway e cols., 1998). O grau de exposição é determinado pela proximidade e susceptibilidade do contato com o caso transmissor, onde a susceptibilidade pode ser determinada pelo *status* “saudável” do indivíduo (Daley e cols., 1992). Uma vez que a pessoa é infectada, o risco acumulativo de desenvolver a doença durante toda a vida do indivíduo é de somente 10%. No entanto, um estudo realizado no ano de 2000 por Vynnycky & Fine, a partir de dados em população britânica, mostrou que o risco de desenvolver TB por toda vida é fortemente dependente do tempo de infecção e da idade do indivíduo. Em pessoas infectadas com o *Mtb*, qualquer alteração entre o balanço dos sistemas de defesa (imunidade) e o bacilo pode afetar o risco de desenvolver a doença (Lienhart, 2001). A idade e variações no sexo na prevalência na TB doença, bem como, na infecção pelo *Mtb* tem sido reportado no mundo inteiro tanto em países considerados desenvolvidos como nos não desenvolvidos (Vynnycky & Fine, 1997). Globalmente, a prevalência da infecção pelo *Mtb* é similar entre homens e mulheres até a fase da adolescência, depois dessa fase a infecção é mais elevada entre os homens (Holmes & Nunn, 1998).

Dos 160 pacientes com TB, menos da metade são mulheres (37,5%), em relação aos homens (62,5%). Essas diferenças neste estudo indicam uma maior freqüência dos indivíduos do sexo masculino no grupo de pacientes, contudo não observamos diferença estatisticamente significativa, dessa forma, não podemos

considerar esta informação uma vez que os indivíduos deste estudo não foram pareados quanto ao sexo. Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças na detecção dos casos e devido à diversidade nas atividades desenvolvidas (Hudelson, 1996) ou por reais diferenças na susceptibilidade à doença (Fine, 1994). Estudos realizados em 1939 (Dinamarca) e 1954 (Inglaterra e Gales) (Groth-Petersen e cols., 1959; Styblo, 1973), demonstraram uma consistente diferença no desenvolvimento da TB em relação a idade e ao sexo. O estudo inglês mostrou uma tendência de desenvolver TB maior entre homens acima de 40 anos, no entanto o risco foi similar entre os sexos com idade inferiores a 15 anos e maior entre mulheres entre o período da adolescência até mais ou menos os 30 anos. Os mesmos dados foram observados em um extenso estudo epidemiológico realizado na Dinamarca nos anos 50, onde os casos notificados de TB foram maiores entre mulheres na idade dos 15 aos 34 anos. Entre as idades de 35 e 44 anos o número de casos foi similar e maior entre os homens acima de 45 anos (73%) do que entre mulheres dessa mesma faixa (Groth-Petersen e cols., 1959). Os mesmos dados foram observados na Nicarágua (Gonzalez, 1993), Kenya (Nunn e cols., 1992), Tanzânia (Ipuge & Styblo, 1995), China (Ministério de Saúde Pública da China, 1994) e Canadá (Grzybowski & Allen, 1964), onde antes dos 14 anos os números de notificações eram similares entre homens e mulheres, ao passo que depois dessa faixa de idade ocorria uma prevalência do sexo masculino. No entanto, um estudo realizado na Gâmbia no ano de 2002 a 2004 encontrou dados controversos nesta população, onde os autores mostraram que a média de idade entre os grupos (TB versus controle) não foi diferente, da mesma forma quando analisados em relação ao sexo.

Quando observamos a média de idade dos voluntários do nosso estudo, não foi possível observar diferença entre os sexos masculino e feminino dos pacientes com TB pulmonar e indivíduos controles. Dados na literatura desde a década de 40 demonstraram que os indivíduos do sexo masculino possuem uma tendência a desenvolver TB numa faixa maior de idade em comparação com as mulheres. Contudo, esses dados não são comprovados em nossa casuística, pois não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade.

O teste tuberculínico é comumente usado como ferramenta para identificar a infecção latente ou não pelo *Mtb* (García-Sancho e cols., 2006). Apesar do uso mundial do teste cutâneo com o PPD e de suas limitações como indicador de positividade, sendo descrita uma faixa extremamente grande (20 a 60% - Converse e cols., 1997), este teste ainda é considerado como padrão na identificação de infecção pelo *Mtb* (Reichman, 1998). Em nosso estudo foi verificado que o teste cutâneo ao PPD mostrou ser ligeiramente maior nas mulheres ($16,9 \pm 8,8$ mm) em comparação com os homens ($14,4 \pm 11,7$ mm) no grupo dos pacientes com TB. Esta diferença em relação ao PPD não mostrou significância estatística ($p=0,06$). Da mesma forma, quando comparamos sadios, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p= 0,90$) da média do PPD (em milímetros) entre homens e mulheres.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura relaciona a positividade ao teste cutâneo PPD como fator de risco para o desenvolvimento da TB em CT dos casos índices (Silva e cols., 2002; Rathi e cols., 2002; Lienhardt e cols., 2003; Collet e cols., 2005). No entanto, em nosso trabalho não foram observadas quaisquer diferenças entre o grupo dos pacientes com TB pulmonar (PPD positivo=49 e negativo=18) e os CT (PPD positivo=20 e negativo=23), independentemente do sexo, em relação à frequência de indivíduos reatores ou não ao PPD cutâneo.

Para alguns autores, como Cantwell e colaboradores (1998), adicionalmente, existem diferenças no risco de desenvolver TB entre diferentes grupos étnicos, no entanto para outros (Stead e cols., 1990), essas diferenças são relacionadas as condições socioeconômicas desses indivíduos. Acredita-se que certos grupos raciais são mais susceptíveis para o desenvolvimento da TB enquanto outros têm desenvolvido uma “resistência natural” (Kushigemachi e cols., 1984). Um estudo populacional realizado em 2003 por Gonzalez e colaboradores na cidade de Houston, Texas, mostrou que entre os adultos com TB soronegativos para o HIV, indivíduos da raça branca apresentavam menor frequência entre o grupo de pacientes que desenvolveram TB extra pulmonar, quando comparados com não brancos. Diferenças entre grupos raciais foram previamente descritas, no entanto, acredita-se que uma larga proporção dessas diferenças pode ser explicada por fatores ambientais e comportamentais

(Kushigemachi e cols., 1984; Cantwell e cols., 1998). Assim, diferentes freqüências são observadas em grupos étnicos distintos, em relação ao polimorfismo de *DBP*, onde entre os caucasianos é observada freqüência maior do grupo Gc2, entre europeus o grupo Gc1S e de modo contrário o grupo Gc1F é mais comum na população negra (Mourant, 1976). Assim, Liu e colaboradores (2006) tentaram explicar porque negros americanos são mais susceptíveis a TB e observaram que esses indivíduos possuem níveis séricos de VD menores do que indivíduos brancos, devido a uma maior produção de melanina na pele, dificultando a produção de VD, que em conseqüência, resulta em uma diminuição da catelicina ou LL-37, um potente antimicrobiano, capaz de destruir o *Mtb*. De acordo com esses dados, e ao analisarmos os dados epidemiológicos brasileiros observaremos que é maior a freqüência de TB em indivíduos negros. Em nossa casuística observamos uma maior freqüência de indivíduos não brancos entre os pacientes. Contudo, não nos propusemos a realizar estudos funcionais para comprovar esta hipótese e os nossos grupos não foram pareados por raça, assim não podemos afirmar existir tal associação em nosso estudo entre diferentes raças e o adoecimento.

Nos dias atuais, vários grupos vêm estudando uma possível associação de doenças degenerativas com os polimorfismos do gene *DBP*, principalmente naqueles presentes no exon 11 nas posições 416 e 420. Assim há relatos de associação com o fenótipo F/F em população japonesa com DPOC (Ishii e cols., 2001; Ito e cols., 2004) e da proteção para DPOC conferida aos portadores do grupo Gc2 (Schellenberg e cols., 1998). Contudo, Bahr e colaboradores (1989), descreveram associação entre o grupo Gc2 e febre reumática na população árabe. Em geral as publicações não necessariamente descrevem o papel dos genótipos e seus respectivos fenótipos em relação à patogenia estudada. Assim, quando os genótipos estudados foram citados temos observado que o genótipo ss (9,3%) parece estar associado à doença de Graves em população polonesa (Kurylowics e cols., 2006). A freqüência deste genótipo difere da encontrada na população estudada (14,5%). A diabetes mellitus tipo 1 parece estar associada ao genótipo HH (Asp/Asp) e hh (Glu/Glu) em população da França (Ongagna e cols., (2001). Hirai e colaboradores (1998), demonstraram associação em população do

Japão em relação aos fenótipos S/S e S/2 ao estudarem a resistência a insulina e o possível desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

Por outro lado, não se observa associação com os polimorfismos de *DBP* na diabetes do tipo 1 em caucasianos americanos de origem européia (Klupa e cols., 1999), bem como na tireoidite de Hashimoto e Doença de Graves em população caucasiana (Pani e cols., 2002), na esclerose múltipla em população japonesa (Niino e cols., 2002), na diabetes mellitus do tipo 2 (T2DM) em caucasianos (Hirai e cols., 1998; Ye e cols., 2001) e na população polonesa (Malecki e cols., 2002) e finalmente na tolerância a glucose em população Indiana (Baier e cols., 1998). As freqüências dos genótipos na posição 416 variaram de 12,3% a 61,5%; 33% a 56,8% e 11% a 30,9%. E na posição 420 as freqüências dos genótipos variaram de 48% a 65%; 31% a 46,9% e 4% a 9,8% nas diversas etnias estudadas em vários países.

Estas divergências quanto à associação ou não dos polimorfismos de *DBP* podem estar associadas aos grupos étnicos. Ao nosso conhecimento não há relatos da freqüência de genótipos para este gene na população brasileira. Na população por nós estudada proveniente do Estado do Rio de Janeiro, as freqüências foram de 32,6%; 47,4% e 20%, na posição 416, para HH, Hh e hh, respectivamente para indivíduos sadios. E na posição 420, as freqüências foram de 52%; 39% e 9%, para SS, Ss, ss, respectivamente para indivíduos sadios. Esses dados demonstram que as freqüências genotípicas no presente estudo encontram-se dentro da faixa encontrada nas demais populações estudadas, em relação aos polimorfismos do gene *DBP*. Apesar de não termos observado significância estatística entre essas freqüências, os valores de p estavam próximos (HH $p = 0,08$; SS $p = 0,06$). Assim, não é possível afirmar que exista uma associação desses genótipos com o adoecimento, para tanto seria necessário aumentar a casuística para melhor entendimento das interações biológicas desses polimorfismos relacionados à TB.

As freqüências dos alelos na posição 416 variaram de 78% a 44,3% e 22% a 56,3%, nas diversas etnias estudadas, enquanto na população por nós estudada a freqüência foi de 55,8% a 44,2%, para H e h, respectivamente para indivíduos sadios. As freqüências dos alelos na posição 420 variaram de 30,6% a 74,3% e 20% a 29,7% nas diversas etnias estudadas, enquanto na população por

nós estudada as freqüências foram de 71,1% e 28,9% para S e s, respectivamente para indivíduos sadios. Ao analisarmos os alelos em pacientes com TB pulmonar e indivíduos sadios, houve diferença estatística em relação aos alelos H e h, que apresentaram mesmo valor de p (**0,04**), porém diferentes OR (1,65) e OR (0,61); IC (0,99-2,74) e IC (0,37-1,01) respectivamente. Esses dados podem suportar uma possível associação do alelo H no adoecimento, uma vez que este se encontra em maior freqüência nos pacientes que desenvolveram TB pulmonar ativa, no entanto, até o presente momento em nossa casuística, não foi possível determinar essa associação.

As freqüências dos fenótipos variaram de 2% a 27%; 21% a 42%; 4,6% a 27%; 7,7% a 34%; 4% a 30,8% e 1% a 10%, nas diversas etnias estudadas, enquanto na casuística por nós estudada as freqüências foram de 11,6%; 20%; 21%; 12,6%; 25,3% e 9,5%, para F/F, F/S, S/S, F/2, S/2 e 2/2, respectivamente para indivíduos sadios. Os resultados das freqüências fenotípicas, encontrados na casuística estudada estão dentro do esperado quando comparados com os resultados de freqüências em outras populações.

Ao nosso conhecimento existem apenas dois artigos na literatura associando os genótipos e fenótipos para *DBP* à TB. Estes trabalhos são da década de 80 e para tanto, foi analisada a isoforma da proteína VDBP, por eletroforese, pois nessa época as técnicas de biologia molecular não estavam avançadas. Assim, os autores descrevem a ocorrência dos grupos Gc1 – assumindo-se os fenótipos S/S, F/S, F/F - (Bahr, e col 1989) em população árabe com freqüência de 31,7% e 42% em pacientes e controles, o que difere dos valores observados por nosso grupo (64,9% e 53,7% respectivamente). Anteriormente, Papiha e colaboradores (1983) haviam reportado a ocorrência do grupo Gc2 - assumindo-se os fenótipos F/2, S/2, 2/2 em 33% e 26% em pacientes e controles na população Indiana, e mais uma vez diferindo dos dados obtidos na casuística estudada (6,9% e 8,4%).

No presente estudo, observamos diferença estatística no fenótipo F/F em relação aos controles ($p=0,004$) quando comparados aos pacientes com TB. De modo interessante à análise entre os indivíduos da população em geral (sadios que não reportaram contato conhecido com pacientes com TB – baixa exposição) e o grupo de indivíduos com TB também foi relevante ($p=0,01$), mas em comparação com indivíduos expostos ao *Mtb* (contatos – baixa exposição) a diferença foi menos relevante ($p=0,047$, OR=2,36 e IC=0,93-6,23). Os fenótipos F/F (ou Gc1F) e o S/S (ou Gc1S) foram estatisticamente significativos quando comparados entre os pacientes com TB e os indivíduos do grupo sadio

respectivamente, onde foi observada uma maior freqüência do alelo Gc1F nos pacientes (26,9%) e maior freqüência de Gc1S entre sadios (30,2%). Foi possível observar significância estatística entre CT e sadios em relação ao fenótipo S/S ($p=0,045$, OR=0,36 e IC=0,1-1,11) e o alelo Gc1S (30,2%), foi observado com maior freqüência entre os sadios. Após essa análise, observamos uma maior freqüência do fenótipo F/F e do alelo Gc1F entre o grupo de pacientes com TB. Esses resultados eram esperados, devido ao fato da nossa população ser fruto de uma grande miscigenação, e da nossa casuística ser composta em grande parte por indivíduos não brancos (58,2%). Da mesma forma, podemos observar uma maior freqüência do fenótipo S/S entre o grupo de indivíduos sadios, quando comparado com pacientes e CT. Assim, pode-se observar uma maior freqüência do fenótipo S/S entre os indivíduos sadios e CT, indicando uma possível associação do mesmo na proteção contra TB. Desta forma, estudos funcionais que correlacionem a capacidade de modulação de macrófagos e/ou células dendríticas e/ou linfócitos pela vitamina D em indivíduos com os diferentes genótipos de *DBP*, poderão auxiliar no entendimento desta associação entre o sistema imune, vitaminas e seus carreadores na susceptibilidade ou resistência a TB.

Segundo Lauridsen e colaboradores (2005) a concentração da VDBP no soro é dependente do fenótipo de DBP, no entanto não há diferença significativa entre os tipos de Gc1S ou Gc1F. Partindo desse ponto, ela separou os fenótipos em três grupos distintos, um denominado de Gc1-1 (Gc1F-1F, Gc1S-1F, Gc1S-1S), Gc1-2 (Gc1S-2, Gc1F-2) e Gc2-2. Se considerarmos esta classificação, da mesma forma poderíamos verificar que os pacientes com TB pulmonar possuem uma maior tendência a possuírem o fenótipo Gc1-1, onde observaríamos uma maior presença do alelo F entre os pacientes com TB pulmonar. Além disso, estes pesquisadores relatam diferença de afinidade de ligação entre o os grupos de Gc e VD, por exemplo: Gc1-1 possui elevada afinidade de ligação, Gc 1-2 média afinidade e Gc2-2 baixa afinidade. Como o fenótipo mais freqüente entre os pacientes com TB pulmonar é o F/F, que integra o grupo Gc1-1, este possui elevada afinidade de ligação com a VD sérica, o que talvez, possa dificultar a quebra da ligação entre a VDBP e a VD intracelular. Assim, indivíduos portadores

desse fenótipo, possivelmente apresentariam baixa modulação da resposta celular dependente de VD. Contudo há controvérsias, já que o fenótipo S/S aparece com maior frequência entre sadios e CT e também está no grupo caracterizado como de elevada afinidade de ligação, porém mais fraca, quando comparada ao F/F (Constans, 1993).

As frequências dos haplótipos variaram de 24% a 29,02%; 17% a 29,7%; 0% a 59,2% e 0% a 54,7%, nas diversas etnias estudadas, enquanto na população por nós estudada a frequência foi de 28,4%; 27,8%; 0 e 43,4%, para Asp-Lys, Asp-Thr, Glu-Lys, e Glu-Thr, respectivamente para indivíduos sadios. Assim, no presente estudo as frequências dos haplótipos estão de acordo com os trabalhos já descritos em outras populações. Ao analisarmos os haplótipos não observamos uma maior frequência do Asp-Thr (43,57%) nos pacientes com TB do que no grupo controle (27,89%) ($p=0,0004$; OR=2,00), contrariamente, observamos uma maior frequência do Glu-Thr (43,69%) ($p=0,046$; OR=0,70 e IC=0,47-1,01) nos controles do que nos pacientes com TB (34,80%), confirmando a presença do aminoácido glutamina entre os controles. Observamos uma maior frequência do haplótipo Asp-Thr entre TB (43,57%) do que nos CT (31,73%) ($p=0,03$; OR=1,66). Bem como, uma maior frequência deste haplótipo entre TB (43,57%) e sadios (23,25%) ($p=0,0006$; OR=2,60), contrariamente o Glu-Thr teve uma maior frequência entre os sadios (47,67%) do que entre TB (34,80%) ($p=0,03$; OR=0,60).

Sabe-se que indivíduos com o fenótipo F/F produzem as proteínas Asp-Thr/Asp-Thr e indivíduos com o fenótipo S/S produzem Glu-Thr/Glu-Thr (Ye e cols., 2001). Sendo assim, a partir desses dados, e sabendo que em nossa casuística o fenótipo F/F apresenta maior frequência entre os pacientes com TB e que, contraditoriamente o S/S apresenta maior frequência entre sadios e CT, conseqüentemente podemos observar uma maior frequência da ocorrência de resíduos de asparagina entre os pacientes e de glutamina entre sadios e CT na posição 416.

Relatos na literatura descrevem que a glutamina tem um papel fundamental na manutenção das funções do sistema imunológico, pois a enzima glutaminase apresenta atividade aumentada em tecidos linfóides e macrófagos e linfócitos utilizam a glutamina de maneira semelhante à utilização de glicose. A glutamina

estimula a proliferação de linfócitos e a fagocitose de macrófagos e influi na diferenciação de células B e na produção de IL-1 por macrófagos. (Leeuwen e cols., 1994, Prado, 1994). Além disso, em murinos participa na produção de óxido nítrico (Murphy & Newsholme, 1998), TNF- α (Murphy & Newsholme, 1998), IL-1 (wallace e cols., 1992) e IL-6 por macrófagos (Yassad e cols., 1997), superóxido por neutrófilos (Curi e cols., 1997), IL-8 por monócitos (Murphy & Newsholme, 1998). Contudo, não podemos afirmar qual seria o ponto de ligação entre a molécula de VDBP e seus receptores em células imunes ou não em relação a uma única mudança de aminoácido. Assim, estudos conformacionais devem ser realizados para compreender tais ligações e o papel funcional da VDBP na TB e outras doenças infecciosas.

CONCLUSÕES

- 1) A associação dos genótipos SS e HH entre os pacientes com TB pulmonar, resultando no fenótipo F/F, foi encontrada com maior frequência nos pacientes com TB pulmonar ativa do que nos indivíduos controle, logo este fenótipo poderia estar associado à susceptibilidade à TB, havendo uma possível chance de desenvolver TB 3,6 vezes maior nos portadores destes genótipos/fenótipo..
- 2) O fenótipo S/S (30,2% (portadores dos genótipos hh/SS) poderia estar associado à resistência, uma vez que foi encontrado em maior frequência nos indivíduos sadios do que nos pacientes com TB (14,5%), havendo uma possível chance do desenvolvimento da TB, aproximadamente, 9 vezes menor (OR=0,4) nos portadores deste fenótipo, quando comparado aos portadores do fenótipo F/F ((HH/SS) (OR=3,58)
- 3) Foi observada uma maior frequência dos genótipos HH (43,7%) e SS (63,8%), no grupo dos pacientes com TB do que no grupo dos indivíduos controles (32,6% e 52%, respectivamente). Assim os indivíduos com estes genótipos poderiam ter uma maior chance de desenvolverem TB.
- 4) Foi observado que a frequência do genótipo **hh** (28%) no subgrupo de sadios foi aproximadamente o dobro da frequência observada no grupo dos pacientes com TB pulmonar ativa (15%), indicando que poderia haver uma possível associação entre indivíduos carreadores deste genótipo e o não adoecimento pela TB.

- 5) Foi observado que o alelo **H** (64,4%) tem maior frequência entre o grupo dos pacientes com TB do que entre o subgrupo de sadios (52,3%). Contrariamente, o alelo **h** (47,7%) apresenta maior frequência entre o subgrupo de sadios do que entre o grupo de pacientes (35,6%); assim, poderia haver associação do alelo **H** com o adoecimento pela TB do mesmo modo, que o alelo **h** poderia estar associado com o não adoecimento pela TB, pelo menos em nossa casuística.

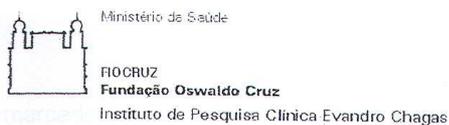
- 6) O haplótipo Asp-Thr (43,57%), apresenta aproximadamente, o dobro da frequência entre os pacientes com TB do que no grupo dos indivíduos controles (27,89%) quanto no subgrupo de sadios (23,25%), indicando uma possível associação deste haplótipo com o desenvolvimento da TB. Contrariamente, o haplótipo Glu-Thr (43,69%), está mais presente entre o grupo dos indivíduos controles e entre o subgrupo de sadios (47,67%) do que no grupo dos pacientes com TB (34,80%) podendo este haplótipo estar associado com o não adoecimento pela TB

PERSPECTIVAS

- 1) Analisar a associação com o *DBP* em outras populações de etnias distintas.
- 2) Iniciar estudos funcionais em células do sistema imune relacionadas aos genótipos e fenótipos descritos neste estudo e em outros estudos prévios realizados em nosso laboratório, levando em consideração outros genes que estejam direta ou indiretamente relacionados a VD, tais como VDR, IFN e NOS2.
- 3) Quantificar os níveis séricos de VD nas suas formas ativa e inativa, bem como VDBP.
- 4) A TB é uma doença multifatorial, por isso, é extremamente importante que no futuro se realizem estudos visando identificar novos genes candidatos a associação com a suscetibilidade ou resistência à TB.

ANEXOS

Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER

Rio de Janeiro, 28 de junho de 2004

Deliberação: APROVADO

Título do Projeto: "Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose – relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adoecimento e estagiamento clínico".

Protocolo nº CEP: 0008.0.009.000-04.

Pesquisador Responsável: Maria da Glória Bonecini de Almeida.

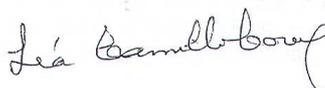
Instituição: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ

Acompanhar e correlacionar os achados clínicos, imunológicos, genéticos e nutricionais em pacientes com tuberculose pulmonar ativa infectados ou não pelo HIV-1 e em indivíduos a risco de desenvolverem a doença pelo *M. tuberculosis*. Tem como objetivos específicos: a) caracterizar o perfil genético para genes candidatos a resistência/susceptibilidade em pacientes tuberculosos, e indivíduos expostos ao *M. tuberculosis*, através da utilização de marcadores genéticos polimórficos que podem estar associados à deficiência em NRAMP1, MBL, receptores par IL-10, IFN- γ (INFR1) e TNF- α (TNF2), HLA-DQB1 e DR2 e o gene responsável pela produção de óxido nítrico (NOS2), vitamina A e receptor para vitamina D; b) caracterizar o perfil imunológico em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, infectados ou não pelo HIV-1, e em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis*, através da identificação da ativação celular, produção de citocinas, e atividade citotóxica; c) avaliar o estado nutricional protéico-calórico em pacientes infectados e expostos ao *Mycobacterium tuberculosis*, através da avaliação antropométrica e de quantificação de micronutrientes como a vitamina A e D; d) correlacionar a evolução clínica da tuberculose ao polimorfismo dos genes candidatos, aos marcadores imunológicos e nutricionais; e) descrever o possível papel dos

marcadores genéticos, imunológicos e nutricionais à infecção pelo *M. tuberculosis*, em indivíduos expostos a este microorganismo.

A metodologia está adequada e os termos de consentimento livre e esclarecido bem elaborados.

Após análise da viabilidade e dos aspectos éticos do estudo e de acordo com a Resolução 196/96 do CNS-MS, a deliberação deste Comitê foi pela **aprovação** do protocolo de pesquisa apresentado e seu envio a CONEP para apreciação.



Dr.^a Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

Anexo B. Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 2393/2004

Registro CONEP: 10544 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE-0008.0.009.000-04

Processo nº 25000.109668/2004-84

Projeto de Pesquisa: "Identificação dos fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para tuberculose – relacionadas à suscetibilidade, à infecção pelo "Mycobacterium tuberculosis"(BK), adoecimento e estagiamento clínico".

Pesquisador Responsável: Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida.

Instituição: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC / FIOCRUZ

Área Temática Especial: Genética humana.

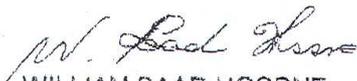
Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1859/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as questões do referido parecer concernentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.
- b) o projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 26 de Novembro de 2004


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Anexo C. Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos

Planos de Saúde - Servidor

Página 1 de 2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR-006495	
Projeto de Pesquisa Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – emergendo proteínas candidatas a vacinas para a tuberculose - relacionados à suscetibilidade, a infecção pelo Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis), adesimento e estabelecimento clínicos.					
Área de Conhecimento 2.11 - Imunologia				Grupo Grupo 1	Nível Não se Aplica
Área(s) Temática(s) Especial(is) 1.1-Gênética Humana.				Fase Fase 1	
Unitermos Tuberculose, marcadores de gravidade, nutrição, imunopência					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 350	Total Brasil 350	Nº de Sujeitos Totais 350	Grupos Especiais		
Placebo NÃO	HIV/AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos SIM	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Mena da Glória Bonocini de Almeida		CPF 723.565.7-07	Identidade 04822362-2 IIP-RJ		
Área de Especialização Imunologia		Maior Titulação Doutorado	Nacionalidade Brasileira		
Endereço Av. Brasil 4355		Bairro Manguinhos	Cidade Rio de Janeiro - RJ		
Código Postal 21045-900	Telefone (21) 2598-4266 /	Fax (21) 2598-9988	E-mail bonocini@conepiec.fiocruz.br		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Res. CNS 195/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: 15/04/2004 Assinatura: <i>Mena da Glória Bonocini de Almeida</i>					
Instituição Onde Será Realizada					
Nome Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC - FIOCRUZ		CNPJ 33.781.065/0010-28	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas		Participação Externa NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Av. Brasil 4355		Bairro Manguinhos	Cidade Rio de Janeiro - RJ		
Código Postal --	Telefone (21) 2598-4260	Fax (21) 2598-8988	E-mail cec@ipec.fiocruz.br		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Res. CNS 195/96 e suas complementares e como esta instituição atende as condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: <i>Mena da Glória Bonocini de Almeida</i> Data: 15/04/2004 Assinatura: <i>Mena da Glória Bonocini de Almeida</i>					
Patrocinador					
Nome FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro-RJ		CNPJ 33.781.065/00-00	Cidade Rio de Janeiro - RJ		
Endereço Avenida Brasil 4355		Bairro Manguinhos	Cidade Rio de Janeiro - RJ		
Código Postal 21045-900	Telefone (21) 3665-8531	Fax (21) 2590-9988	E-mail semp@fiocruz.br		
Responsável Euzenir Sampa		Cargo / Função Vice Presidente Pesquisas - FioCruz			

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 14/04/2004. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

Anexo D. Questionário clínico e epidemiológico

Projeto:

Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose – relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adoecimento e estagiamento clínico.

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Data ___/___/___

Prontuário: _____ Nasc ___/___/___ Idade ___

Cor () 1. Branco 2. Negro 3. Pardo 4. Amarelo Sexo () 0-F 1-M

Profissão: _____ Estado Civil: () 1. Casado 2. Não casado

Endereço: _____ Tel: _____

Local do Tratamento _____

Questionário

RISCO PARA TUBERCULOSE

O Sr. Já teve algum problema de pulmão (tuberculose, mancha no pulmão, água na pleura, pneumonia, Tc) que tivesse sido tratado em posto de saúde ou hospital por mais de 3 meses? () 0-N 1-S. Há quanto tempo: _____

O Sr. Já teve contato com alguma pessoa com tuberculose? () 0-S 1-N

Caso positivo responda: Há quanto tempo? _____

TABAGISMO E ETILISMO

Atualmente fuma? () 0-N 1-S. Quanto? (calcular carga tabágica): _____ maços/ano

Atualmente Bebe? () 0-N 1-S. Quanto? _____

DOENÇAS COMCOMITANTES

Alguma doença em tratamento? () 0-N 1-S Qual? _____

Uso regular de medicações: _____

SINTOMAS

Tosse? () 0-N 1-S. Há quanto tempo? _____ Dor torácica? () 0-N 1-S

Escarro? () 0-N 1-S. Aspectos? _____ Sangue? () 0-N 1-S

Febre? () 0-N 1-S. Emagrecimento? (mais de 10% de peso corporal) () 0-N 1-S

Dispnéia? (Falta de ar ao andar no plano ou subir ladeira?) () 0-N 1-S

FATOR DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HIV

Uso de drogas: injetáveis () 0-N 1-S não injetáveis () 0-N 1-S
 Homossexualismo/bissexualismo () 0-N 1-S Transfusão sanguínea () 0-N 1-S
 Contato heterossexual (múltiplos parceiros) () 0-N 1-S
 Acidente de trabalho () 0-N 1-S
 Outros: _____

PESQUISA PARA HIV

O Sr. já realizou exame de sangue para pesquisa de anti-HIV (AIDS)? () 0-N 1-S
 Resultado: () 0-negativo 1-positivo 2-ignorado data do exame: ___/___/___

TRATAMENTOS

O paciente está sendo tratado para a doença de pulmão ? () 0-N 1-S
 Quais medicações: _____

RADIOGRAMA TORÁCICO

Data: ___/___/___ () 0-normal 1-anormal . Alterações : (_____):
 1. consolidação homogênea 2. Consolidação heterogênea 3. Infiltrado intersticial
 4. Cavidade < 2 cm 5. Cavidade > 2 cm 6. Calcificação 7. Derrame pleural
 8. adenomegalias hilar ou mediastinal. 9. Nódulo 10. Massa 11. Outros: _____

PESQUISA DE TUBERCULOSE

Pesquisa de BAAR no: _____ 0-N 1-S
 Escarro? () 0-N 1-S Escarro espontâneo? () 0-N 1-S Lavado broncoalveolar? ()
 Cultura para BK : _____
 Material _____
 PPD? _____ mm data (___ / ___ / ___)
 Vacinação pelo BCG? _____ cicatriz vacinal _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2007

 assinatura do responsável

Anexo E. Termo de consentimento livre e esclarecido dos casos índices

PROCESSO DE CONSENTIMENTO DE CASOS ÍNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: **Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos** – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose - **relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adoecimento e estagiamento clínico.**

Coordenadora: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida
Imunologia – Dra. Cynthia Horn
Nutrição – Claudia Cardoso
Clínica – Dra. Valéria Rolla

PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Os Drs. Maria da Gloria Bonecini de Almeida, Cynthia Silveira Horn, Valéria Rolla do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Fiocruz), estão conduzindo uma pesquisa em sobre a capacidade dos pacientes com tuberculose pulmonar, e de pessoas em contato com estes pacientes, de responderem a antígenos (proteínas) do bacilo da tuberculose, bem como identificar genes e alterações nutricionais que possam estar envolvidos no desenvolvimento de minha doença.

A tuberculose é uma doença que atinge os pulmões e é comum entre as pessoas que estão convivendo com os pacientes com tuberculose.

Para confirmar a minha participação neste estudo, o diagnóstico de tuberculose será estabelecido pelo achado do bacilo da tuberculose, numa amostra de escarro, escarro induzido ou broncoscopia.

Com diagnóstico confirmado para tuberculose, o tratamento para a tuberculose, a assistência médica, raio-X do tórax e testes sanguíneos serão fornecidos gratuitamente. Serei acompanhado clinicamente e serão solicitados os exames de escarro para identificação do bacilo da tuberculose, hemograma, (exame para avaliar anemia e infecções que quantifica as células e outros componentes do sangue), bioquímica (exame para avaliar as proteínas e o ferro no sangue) e raio-X do pulmão, como procedimento padrão do acompanhamento clínico e também para verificar se nenhum dos medicamentos prescritos me é tóxico e neste caso, as medidas terapêuticas necessárias serão tomadas.

Será realizado o estudo imunogenético para identificar o meu perfil genético a fim de determinar as alterações do sistema de defesa do meu organismo.

Deverei colher sangue para detectar a presença ou não do vírus da Aids e avaliar o meu estado imunitário (capacidade de responder às infecções) e nutricional (para identificar se estou bem nutrido), testes de pele para analisar a presença ou não do bacilo da tuberculose em meu corpo. Em razão de eu ser paciente com tuberculose pulmonar (infetado ou não pelo vírus da aids), estou sendo perguntado se eu concordo em participar desta pesquisa.

PROCEDIMENTOS

Eu concordo em participar deste estudo:

Durante a consulta médica eu responderei a um questionário padronizado que investigará fatores de risco para tuberculose ou outras doenças e investigará minhas queixas atuais.

Após aconselhamento sobre o significado do teste sorológico anti-vírus da AIDS, eu permitirei que 15 a 35 ml de sangue sejam retirados para verificação se estou ou não infectado pelo vírus da AIDS e também para avaliar o estado de defesa do meu organismo, através de células do sangue que serão testadas no laboratório, com vários antígenos do bacilo da tuberculose e, para dosagem de vitaminas A e D. Permitirei que em meu antebraço seja aplicado teste de pele para avaliar a infecção pelo bacilo da tuberculose em meu corpo. O material usado para colheita de sangue e testes de pele serão esterilizados e não reutilizados.

Eu concordo em submeter-me ao RX do tórax e fornecer amostras de escarro e/ou lavado broncoalveolar para exame diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Tempo

Os procedimentos demorarão de 20 minutos para a coleta de sangue.

Riscos/Desconfortos

1. Algumas das questões que constam do questionário podem ser constrangedoras, mas caso eu ache necessário eu poderei interromper a entrevista a qualquer momento.

2. O teste de sangue e da pele normalmente não acarretam problemas locais. Raramente ocorre hematoma e dor no local devido à coleta de sangue, e eczema e prurido devido ao teste de pele, mas ambos regredem espontaneamente sem complicações mais sérias.

Alternativas

Se eu decidir interrompê-lo a qualquer momento, o tratamento médico que eu tenha direito não será prejudicado.

Resultados dos testes

O resultado do teste de sangue para AIDS, será fornecido somente para mim pelo médico assistente responsável de cada Instituição na próxima entrevista, em 15 dias. Nesta entrevista, toda informação que eu ache importante sobre a infecção pelo vírus da AIDS será fornecida, e se necessário eu serei referido ao Centro de Atendimento ao portador do HIV.

Custos para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia em dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais, radiológicos, testes de pele e de escarro serão cobertos pelo estudo. Da mesma forma, não receberei nenhuma quantia pela minha participação.

Anexo F. Termo de consentimento livre e esclarecido dos contactantes

PROCESSO DE CONSENTIMENTO DE CONTACTANTES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose - relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adoecimento e estagiamento clínico.

Coordenadora: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Coordenadores de área: Genética – Dr. Pedro Cabello

Imunologia – Dra. Cynthia Horn

Nutrição – Claudia Cardoso

Clínica – Dra. Valeria Rolla

PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Os Drs. Maria da Gloria Bonecini de Almeida, Cynthia Silveira Horn, Valéria Rolla do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e Dr. Pedro Cabello do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), estão conduzindo uma pesquisa sobre a capacidade dos pacientes com tuberculose pulmonar e de pessoas em contato com estes pacientes, de responderem a antígenos (proteínas) do bacilo da tuberculose, bem como identificar genes e alterações nutricionais que possam estar envolvidos no desenvolvimento da tuberculose.

A tuberculose é uma doença que atinge os pulmões e é comum entre as pessoas que estão convivendo com os pacientes com esta doença.

Para determinar minha participação para este estudo, o diagnóstico de tuberculose deve ser estabelecido pelo achado do bacilo da tuberculose, numa amostra de escarro, escarro induzido (nebulização com soro fisiológico) ou broncoscopia (este exame será acompanhado por médico pneumologista para

sua realização – será necessário coletar amostra diretamente nos pulmões através da introdução de um capilar pela boca ou nariz, com uso de anestesia local) da pessoa com quem convivo na mesma residência (caso índice).

Deverei colher sangue para detectar a presença ou não do vírus da AIDS e avaliar o meu estado imunitário (capacidade de responder à infecções) e nutricional (para identificar se estou bem nutrido), e testes de pele para analisar a presença ou não do bacilo da tuberculose em meu corpo.

Em razão de eu ser comunicante de paciente com tuberculose pulmonar (infectado ou não pelo vírus da AIDS), estou sendo perguntado se eu concordo em participar desta pesquisa.

Será realizado o estudo imunogenético para identificar o meu perfil genético a fim de determinar as alterações do sistema de defesa do meu organismo.

Minha participação será voluntária e terei acesso aos resultados dos exames realizados na consulta posterior a minha participação. Caso seja identificado o vírus da Aids serei encaminhado para um Centro de atendimento ao portador do HIV. Caso seja identificado o bacilo da tuberculose nos testes cutâneos, mas eu não estiver doente serei aconselhado sobre a doença. Caso eu esteja doente, receberei gratuitamente todos os medicamentos, assim como não me será cobrado nenhuma quantia para os procedimentos de diagnóstico e avaliação clínica.

PROCEDIMENTOS

Eu concordo em participar deste estudo:

Eu responderei a um questionário padronizado que investigará fatores de risco para tuberculose ou outras doenças e, responderei a um questionário sobre meus hábitos alimentares.

Permitirei que meu peso, altura e a quantidade de gordura sejam verificados através do uso de balança, régua de altura e adipômetro (aparelho que mede a espessura da camada de gordura sob a pele).

Após aconselhamento sobre o significado do teste sorológico anti-vírus da AIDS, eu permitirei que 15 a 30 ml de sangue sejam retirados para verificação se

estou ou não infectado pelo vírus da AIDS e também para avaliar o estado de defesa do meu organismo (imunidade - através de células do sangue que serão testadas no laboratório, com vários antígenos do bacilo da tuberculose) e, para dosagem de vitaminas A e D. Os testes genéticos serão realizados com uma amostra de DNA (material genético que fornece as características individuais de cada ser humano, animal e vegetal) extraído de meu sangue e onde serão testados para possíveis modificações nas vitaminas (A e D) e em outros hormônios responsáveis pelo controle de várias infecções, inclusive a tuberculose. Permitirei que em meu antebraço seja aplicado teste de pele para avaliar a infecção pelo bacilo da tuberculose em meu corpo. O material usado para coleta de sangue e testes de pele serão esterilizados e não reutilizados.

Eu concordo em submeter-me ao Raio-X do tórax (exame realizado para verificar se ha alteração nos pulmões) e fornecer amostras de escarro (exame realizado para verificar se ha alteração nos pulmões) para exame diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Tempo

Os procedimentos demorarão de 20 minutos para a coleta de sangue e aplicação do teste cutâneo, 20 a 30 minutos para a consulta com profissional do Serviço de Nutrição do IPEC, 20 minutos para entrevista com profissional da área de saúde para verificar seu contacto com o(s) paciente(s) com tuberculose. Será necessária apenas uma consulta de retorno para recebimento dos resultados dos exames de diagnóstico.

Riscos/Desconfortos

1. Algumas das questões que constam do questionário podem ser constrangedoras, mas caso eu ache necessário eu poderei interromper a entrevista a qualquer momento.

2. O teste de sangue e da pele normalmente não acarretam problemas locais. Raramente ocorre hematoma e dor no local devido à coleta de sangue, e

eczema e prurido devido ao teste de pele, mas ambos regridem espontaneamente sem complicações mais sérias.

Tratamento e compensação por danos.

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido gratuitamente pelo IPEC.

Resultados dos testes

O resultado do teste de sangue para AIDS, será fornecido somente para mim pelo médico assistente responsável de cada Instituição na próxima entrevista, em 15 dias. Nesta entrevista, toda informação que eu ache importante sobre a infecção pelo vírus da AIDS será fornecida, e se necessário eu serei referido ao Centro de tratamento médico específico mais próximo de minha residência.

Os resultados de todos os outros estudos (imunogenético e nutricional) e exames (hemograma, bioquímica, raio-x, vitaminas etc) serão fornecidos ao médico que me acompanhará e esclarecidos para mim quanto ao seu significado.

Custos para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia em dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais, radiológicos, testes de pele e de escarro serão cobertos pelo estudo. Da mesma forma, não receberei nenhuma quantia pela minha participação.

Confidenciabilidade dos dados.

Procedimentos serão tomados pelos responsáveis por este estudo, no intuito de proteger a confidenciabilidade das informações que eu forneça. As

informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os responsáveis pela pesquisa terão acesso às informações e questionários. Após o término deste estudo as informações serão transcritas dos questionários para arquivos no computador e estes questionários serão destruídos. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

Consentimento

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário.

Se tiver qualquer dúvida sobre minha participação neste estudo, favor telefone para 3865-9531, 3865-9522 (Dras Maria da Gloria, Cynthia e Valéria)

Assinatura do voluntário

Nome completo

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Nome de alguma pessoa que possa ser contactada, caso o Sr. não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome: _____

Telefone: _____

Rua: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Data: _____

Anexo G. Autorização para realização de pesquisa na rede**RIO****SAÚDE**Coordenadoria de Recursos Humanos
Coordenação de Desenvolvimento de Recursos Humanos
Departamento de Intercâmbio Cultural e Desenvolvimento Científico

Memorando S/CRH/DRH/DIC Nº 03

Rio, 23/03/05

DE: S/CRH/DRH/DIC
PARA: CMS Manoel José Ferreira**REF.: AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA NA REDE**

Após autorização pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IPEC/FIOCRUZ e do Hospital Universitário Pedro Ernesto, respectivamente, assim como o consentimento dessa Unidade, liberamos a pesquisa:

TÍTULO: “Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose – relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), *adoecimento estagiamento clínico.*”

SOLICITANTE: MARIA DA GLÓRIA BONECINI DE ALMEIDA**INSTITUIÇÃO:** FIOCRUZ

Solicitamos o repasse dos resultados à S/CRH/DRH.

SALÉSIA FELIPE DE OLIVEIRA

Diretora

Departamento de Intercâmbio Cultural e Desenvolvimento Científico

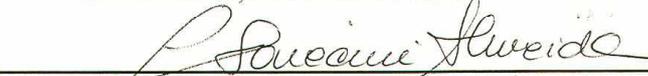
Anexo H. Termo de compromisso e responsabilidade

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **Maria da Gloria Bonecini de Almeida**, coordenadora do projeto de pesquisa intitulado “Identificação de fatores genéticos, nutricionais e imunológicos – empregando proteínas candidatas à vacina para a tuberculose - relacionados à susceptibilidade, à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (latência), adocimento e estagiamento clínico”, sendo este aprovado pelos comitês de Ética em Pesquisa do IPEC/Fiocruz (protocolo número 0008.0.009.000-04), Hospital Pedro Ernesto/UERJ (Protocolo número 926-CEP/HUPE), Secretaria Municipal de Saúde (Memorando S/CRH/DRH/DIC número 3) e CONEP (Protocolo número 2393/2004), tendo como subprojeto “Efeito da vitamina D na análise funcional da resposta imune em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e infecção latente e a associação com polimorfismos de IFN- γ e NOS2”, tese de doutorado de Márcia Andrade da Rocha, do Curso de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do IPEC/Fiocruz; comprometo-me a manter sigilo em relação à identificação dos sujeitos da pesquisa incluídos durante a vigência do projeto acima descrito e comprometo-me a não divulgar, em qualquer que seja o meio de divulgação dos resultados sua identidade.

Da mesma forma, comprometo-me a enviar aos Comitês de Ética toda e qualquer modificação que o projeto venha a sofrer e que diretamente envolva os sujeitos da pesquisa. O material biológico armazenado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 30 de Julho de 2007



Maria da Gloria Bonecini de Almeida

Pesquisadora Titular, chefe do Laboratório de Imunologia e Imunogenética do IPEC/Fiocruz

Maria da Gloria Bonecini de Almeida
Pesquisadora Titular
Chefe do Serviço de Imunologia
IPEC - FIOCRUZ
Mat. 1283477-8

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996; 383: 787–793.

Abbasi AA, Chemplavil JK, Farah S, Muller BF, Arnstein AR. Hypercalcemia in active pulmonary tuberculosis. *Ann Intern Med*. 1979 Mar; 90(3): 324-8.

Abdul-Abbas AJ, al-Delami AM, Yousif TK. HIV infection in patients with tuberculosis in Baghdad (1996-98). *East Mediterr Health J*. 2000 Sep-Nov;6(5-6): 1103-6.

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406(6797): 782-7.

Anand PK, Kaul D. Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310(3): 876-7.

Ando M, Yoshimatsu T, Ko C, Converse PJ, Bishai WR. Deletion of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor *e* results in delayed time to death with bacterial persistence in the lungs of aerosol-infected mice. *Infect Immun*. 2003 Dec; 71(12): 7170-2.

Axelrod A, Gibbs VC, Goeddel DV. The interferon-gamma receptor extracellular domain. Non-identical requirements for ligand binding and signaling. *J Biol Chem*. 1994; 269(22): 15533-9.

Baier LJ, Dobberfuhr AM, Pratley RE, Hanson RL, Bogardus C. Variations in the vitamin D-binding protein (*Gc* locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Aug; 83(8): 2993-6.

Bahr GM, Eales LJ, Nye KE, Majeed HA, Yousof AM, Behbehani K, Rook GA. An association between *Gc* (vitamin D-binding protein) alleles and susceptibility to rheumatic fever. *Immunology*. 1989 May; 67(1): 126-8.

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 Aug; 61(8): 3482-9.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra. A In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195 (5): 603-16.

Bhalla AK. Hormones and the immune response. *Ann Rheum Dis*. 1989 Jan; 48(1): 1-6.

Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 1999 Jun 21; 189(12): 1973-80.

Bellamy R, Hill AV. Host genetic susceptibility to human tuberculosis. *Novartis Found. Symp*. 1998; 217: 3-13; discussion 13-23.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis*. 1999; 179(3): 721-4.

Bellamy R. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin Sci*. 2000; 98(3): 245-50.

Bellamy R. Interferon-gamma and host susceptibility to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 946–947.

Berer A, Stöckl J, Majdic O, Wagner T, Kollars M, Lechner K, Geissler K, Oehler L. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol*. 2000 May; 28(5): 575-83.

Biyoudi-Vouenze R, Cadranel J, Valeyre D, Milleron B, Hance AJ, Soler P. Expression of 1,25(OH)₂D receptors on alveolar lymphocytes from patients with pulmonary granulomatous diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 143(6): 1376-80.

Blackburn GL, Thornton PA. Nutritional assessment of the hospitalized patient. *Med Clin North Am.* 1982 Sep; 63(5): 11103-15.

Boltz-Nitulescu G, Willheim M, Spittler A, Leutmezer F, Tempfer C, Winkler S. Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines. *J Leukoc Biol.* 1995; 58(2): 256-62.

Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 1998 Jan; 66(1):169-75.

Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, et al. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. *J Immunol.* 1998a; 160(9): 4490-9.

Bonecini-Almeida MG, Werneck-Barroso E, Carvalho PB, de Moura CP, Andrade EF, Hafner A, et al. Functional activity of alveolar and peripheral cells in patients with human acquired immunodeficiency syndrome and pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol.* 1998b; 190(2): 112-20.

Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boechat N, Huard RC, Chitale S, Doo H, et al. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun.* 2004; 72(5): 2628-34.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb).* 2003; 83(1-3): 98-106.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001 Nov 1; 167(9): 4974-80

Boutlis CS, Tjitra E, Maniboey H, Misukonis MA, Saunders JR, Suprianto S, et al. Nitric oxide production and mononuclear cell nitric oxide synthase activity in malaria-tolerant Papuan adults. *Infect Immun.* 2003; 71(7): 3682-9.

Braun A, Kofler A, Morawietz S, Cleve H. Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochim Biophys. Acta.* 1993; 1216(3): 385-94.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63: 175-95.

Brodie MJ, Boobis AR, Hillyard CJ, Abeyasekera G, Stevenson JC, MacIntyre I, Park BK. Effect of rifampicin and isoniazid on vitamin D metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1982 Oct; 32(4): 525-30

Brown P, Cathala F, Gajdusek DC. Mycobacterial and fungal skin sensitivity patterns among remote population groups in Papua New Guinea, and in the New Hebrides, Solomon, and Caroline Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 Sep; 30(5): 1085-93.

Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D analogs: perspectives for treatment. *Miner Electrolyte Metab.* 1999 Jul-Dec; 25(4-6): 337-41.

Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *J Clin Invest.* 1981 Mar; 67(3): 589-96.

Bulat-Kardum L, Etokebe GE, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Zaputovic L, et al. Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 2006; 63(2): 142-50.

Burgner D, Xu W, Rockett K, Gravenor M, Charles IG, Hill AV, et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet.* 1998; 352(9135): 1193-4.

Burgner D, Rockett K, Ackerman H, Hull J, Usen S, Pinder M, et al. Haplotypic relationship between SNP and microsatellite markers at the NOS2A locus in two populations. *Genes Immun.* 2003; 4(7): 506-14.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:581-620.

Cadranel J, Hance AJ, Milleron B, Paillard F, Akoun GM, Garabedian M. Vitamin D metabolism in tuberculosis. Production of 1,25(OH)₂D₃ by cells recovered by bronchoalveolar lavage and the role of this metabolite in calcium homeostasis. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 138(4): 984-9.

Cadranel J, Philippe C, Perez J, Milleron B, Akoun G, Ardaillou R, et al. In vitro production of tumour necrosis factor and prostaglandin E₂ by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol.* 1990; 81(2): 319-24.

Cadranel J, Garabedian M, Milleron B, Guillozzo H, Valeyre D, Paillard F, et al. Vitamin D metabolism by alveolar immune cells in tuberculosis: correlation with calcium metabolism and clinical manifestations. *Eur Respir J.* 1994; 7(6): 1103-10.

Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1- α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol.* 2001 Sep; 145(3): 351-7.

Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr.* 2000 Nov; 130(11): 2648-52.

Cantwell MF, McKenna MT, McCray E, Onorato IM. Tuberculosis and race/ethnicity in the United States: impact of socioeconomic status. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr; 157(4 Pt 1): 1016-20.

Cardoso CSA; Avaliação do estado nutricional de portadores de tuberculose pulmonar ativa e correlação com o polimorfismo genético do receptor de vitamina D; 2004. Mestrado [Dissertação em Biologia Molecular e Celular]-Instituto Oswaldo Cruz.

Chan J, Flynn JL. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In F. Fang (ed.). *Nitric oxide and infection.* New York: Editora Plenum Publishers. 1999: 281–310.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; Feb; 63(2): 736-40.

Chan TY. Vitamin D deficiency and susceptibility to tuberculosis. *Calcif Tissue Int.* 2000 Jun; 66(6): 476-8.

Chan TY. Seasonal variations in vitamin-D status and the incidence of tuberculosis in different countries. *Respiration.* 1999; 66(2): 196.

Chandra RK, Kumari S. Nutrition and immunity: an overview. *J. Nutr.* 1994; 124(8 Suppl): 1433S-35S.

Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug; 66(2): 460S-463S.

Chandra RK. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc.* 1999 Aug; 58(3): 681-3.

Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug; 56 Suppl 3: S73-6.

Chandra RK. Nutrient supplementation as adjunct therapy in pulmonary tuberculosis. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004; 74(2): 144-6.

Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1992 Mar; 60(3): 1249-53.

Chen P, Ruiz RE, Li Q, Silver RF, Bishai WR. Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. *Infect Immun.* 2000 Oct; 68(10): 5575-80.

Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp.* 1998; 217:160-72; discussion 172-7.

Choi HS, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit. Care Med.* 2002; 166(2): 178-86.

Cohen MS, Mesler DE, Snipes RG, Gray TK. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. *J Immunol.* 1986 Feb 1; 136(3): 1049-53.

Collet E, Krahenbuhl JD, Gehri M, Bissery A, Zellweger JP. Risk factors for positive tuberculin skin tests among migrant and resident children in Lausanne. Switzerland Swiss Med Wkly. 2005 Dec 10; 135(47-48): 703-9.

Converse PJ, Jones SL, Astemborski J, Vlahov D, Graham NM. Comparison of a tuberculin interferon-gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults: effect of human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis. 1997 Jul; 176(1): 144-50.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. J Exp Med. 1993 Dec 1; 178(6): 2243-7.

Cooke NE. Rat vitamin D binding protein. Determination of the full-length primary structure from cloned cDNA. J Biol Chem. 1986 Mar 5; 261(7): 3441-50.

Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. Infect Immun. 1987 Dec; 55(12): 2945-50.

Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase Am J Physiol. 1997 Oct; 273(4 Pt 1): C1124-9.

Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, O'Keefe GE. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. Crit Care Med. 2003 Jan; 31(1): 152-6.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med. 1992 Jan 23; 326(4): 231-5.

D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. J Clin Invest. 1998 Jan 1; 101(1): 252-62.

Daiger, S.P. et al. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1975; (72): 2076-2080.

Davies P, Grange J. The genetics of host resistance and susceptibility to tuberculosis. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 953: 151-6.

Davies PD, Brown RC, Church HA, Woodhead JS. The effect of anti-tuberculosis chemotherapy on vitamin D and calcium metabolism. *Tubercle.* 1987; 68(4): 261-6.

Davies P, Brown R, Woodhead J. Serum concentrations of vitamin D in untreated tuberculosis. *Thorax.* 1985; 40: 187-90.

Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology *FASEB J.* 2001 Dec; 15(14): 2579-85.

Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1999 Jun; 29(6): 1972-9.

Demple B. Signal transduction by nitric oxide in cellular stress responses. *Mol. Cell Biochem.* 2002; 234-235(1-2): 11-8.

DiMartino SJ, Kew RR. Initial characterization of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) binding site on the neutrophil plasma membrane: evidence for a chondroitin sulfate proteoglycan. *J Immunol.* 1999 Aug; 163(4): 2135-42.

Dinarello CA, Bernheim HA, Duff GW, Le HV, Nagabhushan TL, Hamilton NC, Coceani F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon *J Clin Invest.* 1984 Sep; 74(3): 906-13.

Douglas AS, Strachan DP, Maxwell JD. Seasonality of tuberculosis: the reverse of other respiratory diseases in the UK *Thorax.* 1996 Sep; 51(9): 944-6.

Douglas N, Douglas C. Fisiologia dos hormônios calcitrotóxicos. In: Douglas C, editor. *Tratado de fisiologia aplicada à nutrição.* São Paulo: Robe Editorial; 2002: 885-900.

Dowling GB, Prosser-Thomas EW. Treatment of lupus vulgaris with calciferol. *Lancet.* 1946; 1: 919-22.

Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(2 Pt 2): F157-75.

Ellner JJ. Review: the immune response in human tuberculosis--implications for tuberculosis control. *J Infect Dis.* 1997 Nov; 176(5): 1351-9.

Enarson DA, Ait-Khaled N. Principles and organization of tuberculosis control. *Rev Prat.* 1996 Jun 1; 46(11): 1368-73.

Epidemiology of tuberculosis in the world and Brasil. Rio de Janeiro (RJ). [acesso em 2007 Mar 8]. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br>

Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, et al. Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol.* 2006; 63(2): 136-41.

Feng CG, Bean AG, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1999 Jul; 67(7) :3242-7.

Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, Rees RJ. Delayed-type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. *Lancet.* 1994 Nov 5;344(8932):1245-9.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 93-129.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995 Jun; 2(6): 561-72.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15; 89(24): 12013-7.

Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol.* 2003 Aug; 15(4): 450-5.

Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb).* 2004; 84(1-2): 93-101.

Freitas L M R. Programa de controle de tuberculose do estado do rio de janeiro. Boletim Informativo 2005. [acesso em 2007 Fev 10]. Disponível em <http://www.saude.rj.gov.br/>

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003 Sep 13; 362(9387): 887-99.

Fritsche J, Moser M, Faust S, Peuker A, Büttner R, Andreesen R, Kreutz M. Molecular cloning and characterization of a human metalloprotease disintegrin--a novel marker for dendritic cell differentiation. *Blood*. 2000 Jul 15; 96(2): 732-9.

Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990 Jan; 54(1): 53-63.

Fujiwara H, Kleinhenz ME, Wallis RS, Ellner JJ. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Jan; 133(1): 73-7.

Gannagé-Yared MH, Chemali R, Yaacoub N, Halaby G. Hypovitaminosis D in a sunny country: relation to lifestyle and bone markers. *J Bone Miner Res*. 2000 Sep; 15(9): 1856-62.

Garbe TR, Hibler NS, Deretic V. Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: induction of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. *Infect Immun*. 1999; 67(1): 460-5.

García-Sancho FMC, García-García L, Jiménez-Corona ME, Palacios-Martínez M, Ferreyra-Reyes LD, Canizales-Quintero S, et al. Is tuberculin skin testing useful to diagnose latent tuberculosis in BCG-vaccinated children? *Int J Epidemiol*. 2006; 35(6): 1447-54.

Girard MP, Fruth U, Kieny MPA. Review of vaccine research and development: tuberculosis vaccine. 2005 Dec 30; 23(50): 5725-31.

Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell*. 2000 Apr; 5(4): 717-27.

Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, Bozon MV, Ugliarolo AM, Turbay D, et al. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA*. 1998; 279(3): 226-8.

Goldfeld AE. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004; 84(1-2): 76-81.

Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol*. 2004 Jul; 22(7): 340-5.

Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun*. 1996; 64(3): 913-8.

Grange JM, Davies PD, Brown RC, Woodhead JS, Kardjito T. A study of vitamin D levels in Indonesian patients with untreated pulmonary tuberculosis. *Tubercle*. 1985 Sep; 66(3): 187-91.

Gonzalez JR. Informe anual del programa de control de tuberculosis. Direction General de Hygiene y Infecciones Transmisibles, Programa de Control de Tuberculosis y Lepra, Ministerio de Salud, Gobierno de Nicaragua. 1993

Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smirolto S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):1945-53.

Grzybowski S, Allen EA. The challenge of tuberculosis in decline. A study based on the epidemiology of tuberculosis in ontario, Canada. *Am Rev Respir Dis*. 1964 nov; 90: 707-20.

Groth-Petersen E, Knudsen J, Wilbek E. Epidemiological basis of tuberculosis eradication in an advanced country. *Bull World Health Organ*. 1959; 21:5-49.

Gumireddy K, Reddy CD, Swamy N. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates DBP-maf-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*. 2003 Sep 1; 90(1) :87-96.

Haddad JG, Abrams J, Walgate J. Affinity chromatography with 25-hydroxycholecalciferol ester in the isolation of the binding protein for vitamin D and its metabolites from human serum. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981; 3(1): 43-6.

Hakim I, Bar-Shavit Z. Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element. *J Cell Biochem.* 2003 Apr 1; 88(5): 986-98.

Harbige LS. Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. *Nutr Health.* 1996;10(4):285-312.

Hartmann P, Plum G. Immunological defense mechanisms in tuberculosis and MAC-infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999 Jun; 34(2): 147-52.

Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1997 Jul 15; 159(2): 635-43.

Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, Kilby MD, Moss PA, Chakraverty R. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Jun 1; 170(11): 5382-90.

Hijjar MA, Procópio MJ, Freitas LMRF, Guedes R, Bethlem EP. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro 2005. Rio de Janeiro (RJ): SINAN; [acesso em 2007 Mar 15]. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br>

Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:593-617.

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Chiba M, Kasuga S, Hirai A, Toyota T. Group specific component protein genotype is associated with NIDDM in Japan. *Diabetologia.* 1998 Jun;41(6):742-3.

Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis.* 1994; 170(5): 1229-37.

Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 2002; 360(9344): 1468-75.

Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 2003; 164: 3-28.

Holick MF, Smith E, Pincus S. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Use of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) for treatment of psoriasis *Arch Dermatol.* 1987 Dec; 123(12):1677-1683.

Holmes CB, Hausler H, Nunn P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998 Feb; 2(2): 96-104.

Hudelson P. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors *Tuber Lung Dis.* 1996 Oct; 77(5): 391-400.

Ipuge YA, Rieder HL, Enarson DA Adverse cutaneous reactions to thiacetazone for tuberculosis treatment in Tanzania. *Lancet.* 1995 Sep 9; 346(8976): 657-60.

Ishii T, Keicho N, Teramoto S, Azuma A, Kudoh S, Fukuchi Y, Ouchi Y, Matsuse T. Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis. *Eur Respir J.* 2001 Nov; 18(5): 753-7.

Ito I, Nagai S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Risk and severity of COPD is associated with the group-specific component of serum globulin 1F allele. *Chest.* 2004 Jan;125(1):63-70

Jolly CA. Dietary restriction and immune function. *J Nutr.* 2004 Aug; 134(8): 1853-6.

Kamei Y, Kawada T, Fukuwatari T, Ono T, Kato S, Sugimoto E. Cloning and sequencing of the gene encoding the mouse vitamin D receptor *Gene.* 1995 Jan 23; 152(2): 281-2.

Kanda S, Mochizuki Y, Miyata Y, Kanetake H, Yamamoto N. Effects of vitamin D(3)-binding protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) on angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep 4; 94(17): 1311-9.

Kankova M, Luini W, Pedrazzoni M, Riganti F, Sironi M, Bottazzi B, Mantovani A, Vecchi A. Impairment of cytokine production in mice fed a vitamin D₃-deficient diet. *Immunology.* 1991 Aug; 73(4): 466-71.

Kaufmann SH. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity*. 2006 Apr; 24(4): 351-7.

Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med*. 2005 Apr; 11(4 Suppl): S33-44.

Keane VP, de Klerk N, Krieng T, Hammond G, Musk AW. Risk factors for the development of non-response to first-line treatment for tuberculosis in southern Vietnam. *Int J Epidemiol*. 1997 Oct; 26(5): 1115-20.

Kew RR, Mollison KW, Webster RO. Binding of Gc globulin (vitamin D binding protein) to C5a or C5a des Arg is not necessary for co-chemotactic activity. *J Leukoc Biol*. 1995 Jul; 58(1): 55-8.

Kew RR, Sibug MA, Liuzzo JP, Webster RO. Localization and quantitation of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) in human neutrophils. *Blood*. 1993 Jul 1; 82(1):274-83.

Kew RR, Webster RO. Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J Clin Invest*. 1988 Jul; 82(1): 364-9.

Kirk RL, Serjeantson SW, Zimmet P. Genes and diabetes in the Pacific. In: Mimura G, Baba S, Goto Y, Kobberling J (eds) *Clinicogenetic genesis of diabetes mellitus*. Amsterdam Excerpta Medica. 1982; 34-41.

Kisker O, Onizuka S, Becker CM, Fannon M, Flynn E, D'Amato R, Zetter B, Folkman J, Ray R, Swamy N, Pirie-Shepherd S. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia*. 2003 Jan-Feb; 5(1): 32-40.

Klupa T, Malecki M, Hanna L, Sieradzka J, Frey J, Warram JH, Sieradzki J, Krolewski AS. Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. *Eur J Endocrinol*. 1999 Nov; 141(5):490-3.

Koga Y, Naraparaju VR, Yamamoto N. Antitumor effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Jan; 220(1): 20-6.

Kramnik I, Boyartchuk V. Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5(1): 111-7.

Kulkarni AD, Rudolph FB, Van Buren CT. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. *J Nutr.* 1994 Aug; 124(8 Suppl): 1442S-1446S.

Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Pujalon O, Alpers M, et al. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184(3): 330-6.

Kun JF, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kremsner PG. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet.* 1998; 351(9098): 265-6.

Kushigemachi M, Schneiderman LJ, Barrett-Connor E. Racial differences in susceptibility to tuberculosis: risk of disease after infection. *J Chronic Dis.* 1984; 37(11): 853-62.

Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages *Infect Immun.* 1997 May; 65(5): 1936-8.

Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, Dockrell H, Pasvol G, Hill AV. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6; 95(1): 270-5.

Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Moller HJ, Mosekilde L, Nexø E. Female premenopausal fracture risk is associated with gc phenotype. *J Bone Miner Res.* 2004 Jun; 19(6): 875-81.

Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexø E. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jul; 77(1): 15-22.

Lemire JM, Adams JS. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the passive transfer of cellular immunity by a myelin basic protein-specific T cell clone. *J Bone Miner Res.* 1992 Feb; 7(2): 171-7.

Lienhardt C. From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis. *Epidemiol Rev.* 2001; 23(2): 288-301.

Lienhardt C, Sillah J, Fielding K, Donkor S, Manneh K, Warndorff D, et al. Risk factors for tuberculosis infection in children in contact with infectious tuberculosis cases in the Gambia, West Africa. *Pediatrics.* 2003; 111(5 Pt 1): 608-14.

Lim TK. Human genetic susceptibility to tuberculosis. *Ann Acad Med Singapore.* 2000 May; 29(3): 298-304.

Lips P. Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 May; 89-90(1-5): 611-4.

Lio D, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Motta M, Franceschi C, Malaguarnera M, et al. Association between the MHC class I gene HFE polymorphisms and longevity: a study in Sicilian population. *Genes Immun.* 2002; 3(1): 20-4.

Loudon RG, Spohn SK. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1969 Jan; 99(1): 109-11.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006 Mar 24; 311(5768): 1770-3. Epub 2006 Feb 23.

MacDonald D, Swaminathan R. Seasonal variation in 25-OH vitamin D in plasma of Hong Kong Chinese. *Clin Chem.* 1988 Nov; 34(11): 2375.

McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000 Aug 17; 406(6797): 735-8.

Malecki MT, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, Sieradzki J. Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002 Aug; 57(2): 99-104.

Martineau AR, Honecker FU, Wilkinson RJ, Griffiths CJ. Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2007a; 103(3-5): 793-8.

Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, Packe GE, Davidson RN, Eldridge SM, Maunsell ZJ, Rainbow SJ, Berry JL, Griffiths CJ. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007b Jul 15; 176(2): 208-13.

Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, Davidson RN, Sørensen OE, Kampmann B, Griffiths CJ, Wilkinson RJ. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol.* 2007c Jun 1;178(11):7190-8.

Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* 2002 Apr; 8(4): 174-9.

Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, van Santen HM, Ploegh HL, Rock KL, Bloom BR. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15; 93(21): 11786-91.

McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med.* 1992; 93(1): 69-77.

McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchetti JC, Jacobs WR, Russell DG. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000 Aug 17; 406(6797): 683-5.

Mehra V, Gong JH, Iyer D, Lin Y, Boylen CT, Bloom BR, Barnes PF. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J Infect Dis.* 1996 Aug; 174(2): 431-4.

Metcalf JP, Thompson AB, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Rennard SI, Robbins RA. Gcglobulin functions as a cochemotaxin in the lower respiratory tract. A potential mechanism for lung neutrophil recruitment in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Apr; 143(4 Pt 1): 844-9.

Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Exp Med*. 2001 Feb 5; 193(3): 271-80.

Moran A, Ma X, Reich RA, Graviss EA. No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Jan; 11(1): 113-5.

Moreira CA, Hernández HL, Arias NL, Castaño MC, Ferro BE, Jaramillos E. Initial drug resistance as a threat for tuberculosis control: the case of Buenaventura, Colômbia. *Biomedica*. 2004 Jun; 24 Supp 1: 73-9.

Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, Dinubile MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov; 160(5 Pt 1): 1673-81.

Müller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH. Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun*. 1987 Sep; 55(9): 2037-41.

Murphy C, Newsholme P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production *Clin Sci (Lond)*. 1998 Oct; 95(4): 397-407

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest*. 1997 Nov 15; 100(10): 2417-23.

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(2): 130-1.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2000; 97(16): 8841-8.

Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*. 1996 May 1; 183(5):2293-302.

Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MS. *J Neuroimmunol.* 2002 Jun;127(1-2):177-9

Norman AW, Manchand PS, Uskokovic MR, Okamura WH, Takeuchi JA, Bishop JE, Hisatake JI, Koeffler HP, Peleg S. Characterization of a novel analogue of 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ with two side chains: interaction with its nuclear receptor and cellular actions. *J Med Chem.* 2000 Jul 13; 43(14): 2719-30.

Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1997; 65(9): 3644-7.

Nunn P, Gicheha C, Hayes R, Gathua S, Brindle R, Kibuga D, Mutie T, Kamunyi R, Omwega M, Were J, et al. Cross-sectional survey of HIV infection among patients with tuberculosis in Nairobi, Kenya *Tuber Lung Dis.* 1992 Feb; 73(1): 45-51.

Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha- and interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991 Sep; 59(9): 3021-5.

Ohno H, Zhu G, Mohan VP, Chu D, Kohno S, Jacobs WR Jr, et al. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 2003; 5(9): 637-48.

OMS (WHO). Tuberculosis. In: World Health Organization, 2007

OMS (WHO). Tuberculosis. In: World Health Organization; 2004.

OMS (WHO). Tuberculosis. In: World Health Organization; 2005.

Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet.* 2002; 32(1): 97-105. Erratum in: *Nat. Genet.* 2002; 32(2): 331.

Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes*. 2000 Aug; 49(8): 1301-7.

Panichi V, Migliori M, Taccola D, Consani C, Giovannini L. Effects of calcitriol on the immune system: new possibilities in the treatment of glomerulonephritis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 Nov; 30(11): 807-11.

Pani MA, Regulla K, Segni M, Hofmann S, Hübner M, Pasquino AM, Usadel KH, Badenhop K. A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Graves' disease but not with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun; 87(6): 2564-7.

Papiha SS, Agarwal SS, White I. Association between phosphoglucosyltransferase (PGM1) and group-specific component (Gc) subtypes and tuberculosis. *J Med Genet*. 1983 Jun; 20(3): 220-2.

Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000 Mar 1; 164(5): 2405-11.

Philpott M, Ferguson LR. Immunonutrition and cancer. *Mutat Res*. 2004 Jul 13; 551(1-2): 29-42.

Piedade J, Viveiros M, Esteves A. Sida e tuberculose: ligações perigosas. [acesso em 2007 Jun 10]. Disponível em: WWW.ordembilogos.pt.

Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2000; 164(9): 4443-51.

Platanias LC, Vogelzang NJ Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects. *Am J Med*. 1990 Nov; 89(5): 621-9.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum. Immunol*. 2000; 61(9): 863-6.

Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*. 1983 Sep 16; 221(4616): 1181-3.

Rathi SK, Akhtar S, Rahbar MH, Azam SI. Prevalence and risk factors associated with tuberculin skin test positivity among household contacts of smear-positive pulmonary tuberculosis cases in Umerkot, Pakistan. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002 Oct; 6(10): 851-7.

Raviglione MC 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003; 83(1-3): 4-14.

Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002 *Tuberculosis (Edinb)*. 2003; 83(1-3): 4-14.

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3 by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1987 Aug 15; 262(23): 10931-7.

Reichman LB. A scandalous incompetence...continue. *Chest*. 1998; 113: 1153-1154.

Remus N, Alcaïs A, Abel L. Human genetics of common mycobacterial infections. *Immunol Res*. 2003; 28(2): 109-29.

Riggs BL. Vitamin D-receptor genotypes and bone density. *N Engl J Med*. 1997; 337(2): 125-6.

Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun*. 1998; 66(11): 5314-21.

Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec; 82(23): 8213-7.

Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD4(+) alpha beta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gamma delta TCR(+) T-cell

responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun*. 1999 Dec; 67(12): 6461-72.

Roncada M. Vitaminas lipossolúveis. In: Dutra-de-Oliveira J, Marchini J, editors. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier; 2000;167-189.

Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*. 1987 Oct; 62(2): 229-34.

Rook GA. The role of vitamin D in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138(4): 768-70.

Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. Association between tuberculosis and a polymorphic NF kappa B binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*. 2003 May 31; 361(9372): 1871-2.

Roth DE, Soto G, Arenas F, Bautista CT, Ortiz J, Rodriguez R, Cabrera L, Gilman RH. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2004 Sep 1; 190(5): 920-7. Epub 2004 Jul 29.

Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis*. 1997; 78(5-6): 247-55.

Ruffino-Netto A. Tuberculosis: the neglected calamity. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Jan-Feb; 35(1): 51-8.

Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, Liebhaber SA, Cooke NE. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest*. 1999 Jan; 103(2): 239-51..

Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol*. 2002 Mar-Apr; 216(1-2): 65-72.

Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol. Cell Biol*. 2007; 85(2): 103-11.

Sawada N, Sakaki T, Kitanaka S, Kato S, Inouye K. Structure-function analysis of CYP27B1 and CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *Eur J Biochem.* 2001; 268(24): 6607-15.

Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J. Exp. Med.* 2000; 192(3): 347-58.

Schellenberg D, Paré PD, Weir TD, Spinelli JJ, Walker BA, Sandford AJ. Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Mar; 157(3 Pt 1):957-61

Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res.* 2001; 2(3): 157-63. Epub. 2001 Mar 29.

Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir. Cell Mol Biol.* 2005 Apr; 32(4): 251-6.

Schiodt FV, Ott P, Tygstrup N, Dahl B, Bondesen S. Temporal profile of total, bound, and free Gc-globulin after acetaminophen overdose. *Liver Transpl.* 2001 Aug; 7(8): 732-8.

Schiodt FV, Bondesen S, Petersen I, Dalhoff K, Ott P, Tygstrup N. Admission levels of serum Gc-globulin: predictive value in fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 1996 Apr; 23(4): 713-8.

Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res.* 2000 May; 111: 172-9.

Selroos O, Pasternack A, Virolainen M. Skin test sensitivity and antigen-induced lymphocyte transformation in uraemia. *Clin Exp Immunol.* 1973 Jul; 14(3): 365-70.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, Walker AT, Friedland GH. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1989 Mar 2; 320(9): 545-50.

Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*. 1999 Aug; 67(8): 3980-8.

Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol*. 2000 Jul 1; 165(1): 353-63.

SHAW JB, WYNN-WILLIAMS N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *Am Rev Tuberc*. 1954 May; 69(5): 724-32

Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 1996; 58(4): 367-76.

Silva VM, Cunha AJ, Kritski AL. Tuberculin skin test conversion among medical students at a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 Oct; 23(10): 591-4

Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol*. 2003 Jan 1; 170(1): 430-7.

Smith KC, Armitige L, Wanger A. A review of tuberculosis: reflections on the past, present and future of a global epidemic disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2003 Oct; 1(3): 483-91.

Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YE. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta*. 2006 Oct; 372(1-2): 33-42.

Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001; 106(6): 675-83.

Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by Mycobacterium tuberculosis. *N Engl J Med*. 1990 Feb 15; 322(7): 422-7.

Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection *Science*. 1997 Jun 13; 276(5319): 1684-7.

Stenger S, Modlin RL. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens *Curr Opin Immunol*. 1998 Aug; 10(4): 471-7.

Swamy N, Ghosh S, Ray R. Bacterial expression of human vitamin D-binding protein (Gc2) in functional form *Protein Expr Purif*. 1997 Jun; 10(1): 115-22.

Swamy N, Ghosh S, Schneider GB, Ray R. Baculovirus-expressed vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) activates osteoclasts and binding of 25-hydroxyvitamin D(3) does not influence this activity. *J Cell Biochem*. 2001; 81(3): 535-46.

Styblo K. The epidemiology and control of tuberculosis in developed countries *Ther Umsch*. 1973 Mar; 30(3): 199-206.

Tabata T, Suzuki R, Kikunami K, Matsushita Y, Inoue T, Inoue T, Okamoto T, Miki T, Nishizawa Y, Morii H. The effect of 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on cell-mediated immunity in hemodialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 Nov; 63(5): 1218-21.

Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol*. 1998 Jan 1; 160(1): 209-18.

Tascon RE, Soares CS, Ragno S, Stavropoulos E, Hirst EM, Colston MJ. Mycobacterium tuberculosis-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. *Immunology*. 2000 Mar; 99(3): 473-80.

Tashiro K, Abe T, Oue N, Yasui W, Ryoji M. Characterization of vitamin D-mediated induction of the CYP 24 transcription. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 226(1-2): 27-32.

Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21; 96(26): 15190-5.

Thomasset M. Vitamin D and the immune system. *Pathol Biol (Paris)*. 1994 Feb; 42(2): 163-72.

Tokuda N, Mano T, Levy RB. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 antagonizes interferon-gamma-induced expression of class II major histocompatibility antigens on thyroid follicular and testicular Leydig cells. *Endocrinology*. 1990 Sep; 127(3): 1419-27.

Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med*. 1986; 163(5): 1162-72.

Toossi Z, Sedor JR, Lapurga JP, Ondash RJ, Ellner JJ. Expression of functional interleukin 2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Invest*. 1990 Jun; 85(6): 1777-84.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1; 192(1): 89-97.

Ustianowski A, Shaffer R, Collin S, Wilkinson RJ, Davidson RN. Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London. *J Infect*. 2005; 50(5): 432-7.

Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* *N Engl J Med* 1998 Jun 11; 338(24): 1783.

van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*. 2004 Dec; 4(12): 739-49.

van Halteren AG, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes*. 2002 Jul; 51(7): 2119-25.

Vasconcelos M I L, A GLUTAMINA aplicada a Nutrição Clínica, Parenteral e Enteral. 1994. Rio de Janeiro (RJ): Site da Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE) e Sociedade Brasileira de Nutrição Clínica (SBNC) [acesso em 2007 Sep 8] Disponível em: <http://www.saudenarede.com.br/>.

Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol. Infect.* 1997; 119: 183-201.

Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism.* 1992 Sep; 41(9): 1016-20

Wadee AA, Sussman G, Kuschke RH, Reddy SG. Suppression of cytokine production by supernatants from CD8+ lymphocytes activated by mycobacterial fractions: the role of interleukins 4 and 6. *Biotherapy.* 1993; 7(2): 125-36.

Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir. J.* 1998; 11: 809–815.

Wallis RS, Amir-Tahmasseb M, Ellner JJ. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte western blot. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1990; 87(9): 3348-52.

Waters WR, Nonnecke BJ, Rahner TE, Palmer MV, Whipple DL, Horst RL. Modulation of *Mycobacterium bovis* specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1204–12.

White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11(8): 320-7.

Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol.* 2004 Sep 1; 173(5): 3432-6.

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet.* 2000; 355(9204): 618-21.

Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand J Immunol.* 1993 Dec; 38(6): 535-40.

Yamamoto N, Naraparaju VR. A defect in inducible b-galactosidase of B lymphocytes in the osteopetrotic (mi/mi) mouse. *Immunol.* 1996; 88: 604-610.

Yamamoto N, Naraparaju VR, Moore M, Brent LH. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein by alpha-N-acetylgalactosaminidase detected in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Mar; 82(3): 290-8.

Yamamoto N, Homma S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci .USA.* 1991 Oct 1; 88(19): 8539-43.

Yang, S., Smith, C., Prahl, J. M., Luo, X., and DeLuca, H. F. Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo. *Arch Biochem. Biophys.* 1993; 303, 98–106.

Yassad A, Lavoine A, Bion A, Daveau M, Husson A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. *FEBS Lett.* 1997 Aug 11; 413(1): 81-4.

Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Metabolism.* 2001 Mar; 50(3): 366-9.

Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci .USA.* 1998; 95(16): 9578-83.

Zarrabeitia MT, Riancho JA, de Francisco AL, González-Macías J. Effect of physiological concentrations of calcitriol on lymphocyte proliferation in normal subjects and in patients with renal failure. *Nephron.* 1990; 55(2): 110-3.

Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63(8): 3231-4.

Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003; 89(5) :552-72.