



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO EXON – 1 DO GENE  
*MBL (MANNOSE-BINDING LECTIN)* EM PACIENTES  
PORTADORES DE TUBERCULOSE**

MAURO SÉRGIO MOURA DE ARAÚJO

Belém-Pará  
2009

**MAURO SÈRGIO MOURA DE ARAÙJO**

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO EXON – 1 DO GENE  
*MBL (MANNOSE-BINDING LECTIN)* EM PACIENTES  
PORTADORES DE TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto

Belém-Pará  
2009

MAURO SÈRGIO MOURA DE ARAÙJO

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO EXON – 1 DO GENE *MBL*  
(*MANNOSE-BINDING LECTIN*) EM PACIENTES PORTADORES DE  
TUBERCULOSE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biológica de Agentes Infeciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

**Banca Examinadora:** Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Karla Ribeiro  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Sheyla Mara de Almeida Ribeiro  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Antonia Benedita Rodrigues Vieira (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Belém, 31 de Março de 2009

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós."

[\[Marcel Proust \]](#)

Dedico este trabalho a minha Família: Minha esposa Lúcia Carla, meus filhos Carla Juliana e Victor Matheus, vocês são a razão e o sentido de tudo. Obrigado pela paciência, compreensão e amor incondicional que me devotam.

## **AGRADECIMENTOS**

Manifesto meu sincero agradecimento a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo. E, em especial:

A Lúcia Carla, esposa e companheira, presente em todos os momentos, cuja compreensão e apoio foram fundamentais para a concretização deste estudo.

A Ambrósio, Carmita e Maura, pai, madrasta e mãe, amigos acima de tudo, pelo incentivo e carinho sempre a mim dedicados, que tanto me ajudaram nos momentos difíceis no percurso deste estudo.

Ao apoio sempre presente dos irmãos Marco Antônio e Cezar Henrique.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto, pela orientação e oportunidade. Obrigado pela acolhida, incentivo e investimento na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ishak, pelo exemplo de dedicação, competência e apoio a todos os alunos do Laboratório de Virologia.

A farmacêutica Ednelza, amiga e propulsora deste estudo. Obrigado pela força e incentivo.

Ao biólogo Felipe, amigo iluminado, sempre presente, ajuda fundamental para realização deste trabalho.

Aos pacientes e colegas funcionários do HUIBB que voluntariamente participaram deste estudo, e sem os quais a realização do mesmo seria impossível.

Às biomédicas Renata e Lucinda, pela paciência e dedicação nas orientações no laboratório de virologia.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado e a Prof<sup>a</sup> MsC.Vânia Nakauth pelo apoio e sugestões, sempre muito importantes, desde a qualificação.

À farmacêutica Rosimar, generosa e paciente, sempre disponível para esclarecimento de dúvidas.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do HUIBB, pela compreensão e boa vontade que tiveram ao aceitar participar deste estudo.

Ao Gabriel, técnico de laboratório do HUIBB, pela ajuda imprescindível na coleta das amostras dos pacientes.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia, Helena, Di Paula, Paula, Regiane, Gisele, Sandra, Leonardo e Iran, pela agradável convivência e apoio em vários momentos nesta jornada.

À CAPES por financiar parte desse projeto.

À UFPA e ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
	<b>RESUMO</b> .....	11
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL).....	13
1.1.1	Estrutura da MBL.....	14
1.1.2	O Gene da MBL.....	18
1.1.3	MBL nas Doenças.....	21
1.2	A TUBERCULOSE.....	23
1.2.1	Epidemiologia da Tuberculose.....	25
1.2.2	Diagnóstico da Tuberculose.....	27
1.2.3	Imunidade ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
1.2.4	MBL e Tuberculose.....	29
1.3	OBJETIVOS.....	32
1.3.1	Objetivo Geral.....	32
1.3.2	Objetivo Específico.....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1	COLETA E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	33
2.1.1	Pacientes com tuberculose.....	33
2.1.2	Grupo Controle.....	34
2.1.3	Comitê de Ética em Pesquisa.....	34
2.2	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	35
2.2.1	Extração do DNA.....	35
2.2.2	Determinação dos Polimorfismos no Éxon 1.....	37
2.2.2.1	Eletroforese.....	38
2.3	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	38
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39

<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das frequências alélicas do gene <i>MBL</i> na população de pacientes com Tuberculose e Grupo Controle.....	40
Tabela 2 - Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose e no Grupo Controle.....	41
Tabela 3 - Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TEP) e no Grupo Controle (GC).....	42
Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TEP) e no Grupo Controle (GC).....	43
Tabela 5 – Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar e Grupo Controle.....	44
Tabela 6 - Distribuição das frequências alélicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Grupo Controle (GC).....	45
Tabela 7 - Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Tuberculose Extra pulmonar (TEP).....	46
Tabela 8 - Distribuição das frequências alélica do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Tuberculose Extra pulmonar (TEP).	47
Tabela 9 - Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMR) e Grupo Controle (GC).....	48
Tabela 10 – Distribuição das frequências Alélicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMR) e Grupo Controle (GC).....	49

## RESUMO

A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína considerada de fase aguda com importante papel na primeira linha de defesa do sistema imune inato, cujos níveis séricos são determinados geneticamente. A MBL ativa a via da lectina do complemento, além de mediar a opsonização e fagocitose de microrganismos. Vários estudos associam os níveis séricos de MBL à suscetibilidade ou resistência a agentes infecciosos entre eles o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose humana. Neste estudo, com o objetivo de avaliar a ocorrência de uma possível associação entre os polimorfismos e a tuberculose, avaliamos as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em um grupo de 167 pacientes com tuberculose, subdivididos em 3 grupos: pacientes com tuberculose pulmonar, pacientes com tuberculose extrapulmonar, pacientes com tuberculose multirresistente a drogas, e grupo controle com 159 profissionais da saúde, negativos para tuberculose. A identificação dos alelos *MBL* \*A, \*B, \*C e \*D foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências de iniciadores específicos e posterior digestão enzimática. As análises das frequências alélicas e genotípicas do éxon 1 não mostraram qualquer diferença significativa entre pacientes com tuberculose e grupo controle ( $p>0,05$ ). Não foram observadas associações significativas entre os grupos de tuberculose pulmonar, extrapulmonar e tuberculose multirresistente a drogas, quando relacionados entre si e ao grupo controle. Os dados obtidos em nosso estudo não demonstraram evidências de qualquer influência das variações do éxon 1 do gene *MBL* na tuberculose ativa, sugerindo que os polimorfismos nessa região do gene não tem nenhuma influencia na susceptibilidade à tuberculose.

## ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) is considered an acute phase protein with important role in the first line of defense of the innate immune system, whose serum levels are genetically determined. The MBL activates the lectin pathway of complement, and mediate the phagocytosis of microorganisms and opsonization. Several studies have associated serum levels of MBL to susceptibility or resistance to infectious agents including the *Mycobacterium tuberculosis*, causative agent of human tuberculosis. Aiming to evaluate the occurrence of a possible association between *MBL* gene polymorphisms and tuberculosis, it was evaluated the frequencies of mutations in exon 1 of *MBL* gene in a group of 167 TB patients, divided into 3 groups: patients with pulmonary tuberculosis, with extrapulmonary tuberculosis, patients with multiresistant tuberculosis to drugs and the control group with 159 health professionals. The identification of alleles MBL\**A*, \**B*, \**C* and \**D* was performed by polymerase chain reaction, using specific sequences of primers and subsequent enzymatic digestion. The analysis of allelic and genotypic frequencies of exon 1 did not show any significant difference between patients with tuberculosis and control group ( $p > 0.05$ ). There were no significant associations between groups of pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis and multidrug drug among themselves and when connected to the control group. Data from our study showed no evidence of any influence of variations in the exon 1 of MBL gene in active tuberculosis, suggesting that the gene polymorphism has no influence on susceptibility to tuberculosis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos que penetram as barreiras mecânicas (Fearon & Lockley, 1996). Este é composto por proteínas solúveis e ligadas à membrana com especificidade pré-definida aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que, em muitos casos, envolvem o reconhecimento de moléculas de carboidratos presentes em diversos microrganismos. O sistema imune adaptativo, por outro lado, funciona subsequentemente como uma importante ferramenta na geração de respostas específicas contra agentes infecciosos. Embora sejam considerados como sistemas separados, os componentes dos sistemas imune inato e adaptativo interagem, frequentemente, objetivando a eliminação do agente infeccioso (Fearon & Lockley, 1996).

Muitas evidências laboratoriais sustentam a importância da Lectina Ligadora de Manose (MBL) na ativação do sistema complemento, via imunidade inata (Petersen *et al.*, 2000), constituindo o primeiro componente de ativação da via das lectinas; atuando na neutralização de microrganismos patogênicos por um mecanismo independente de anticorpos (Turner, 1996; Wallis & Cheng, 2000).

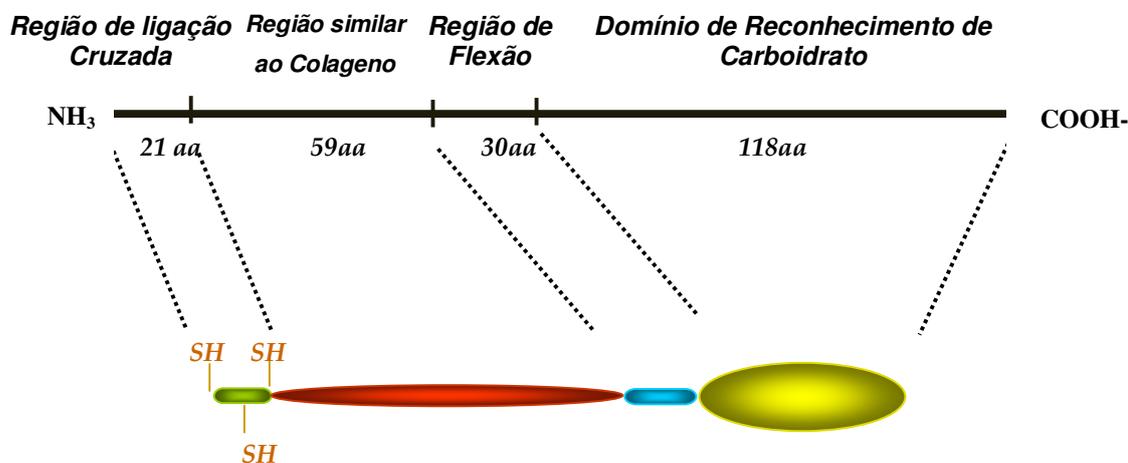
A MBL é encontrada no soro de mamíferos, sendo considerada uma proteína de fase aguda (Ezerkowitz, 1998; Thiel *et al.*, 1992) que, pertence a uma família de proteínas chamadas de colectinas, cuja secreção é efetuada pelo fígado, sendo que, alguns leucócitos parecem, também, poder sintetizá-la (Ogden *et al.*, 2001; Kilpatrick *et al.*, 2003).

Em recém-natos, a concentração da MBL corresponde a 60% da encontrada em adultos (Thiel *et al.*, 1992). A concentração sérica da MBL varia significativamente, podendo ir de 0 a 5µg/mL em indivíduos saudáveis (Presanis *et al.*, 2003; Turner, 2003), com aumento de 2 a 3 vezes durante resposta de fase aguda (Thiel *et al.*, 1992).

A principal função biológica da MBL é a opsonização, pois suas estruturas de colágeno são ligantes para receptores de colectinas presentes nos fagócitos, atuando diretamente como opsonina (Holmskov *et al.*, 1994; Summerfield *et al.*, 1995; Turner, 1996).

### 1.1.1 A Estrutura da MBL

A MBL humana é composta por polímeros de até 6 subunidades, sendo que cada monômero é formado por 3 cadeias polipeptídicas idênticas, de 32 kD, ligadas por pontes de dissulfeto, cada cadeia polipeptídica apresenta: um domínio terminal NH<sub>2</sub>, rico em cisteína, uma seqüência de segmento que se assemelha ao colágeno, uma região de flexão e um domínio de reconhecimento de carboidratos – CRD (figura 1). Os domínios CDR conferem à molécula a capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos com especificidade primária para manose, fucose ou N-acetilglucosamina (Holmskov *et al.*, 1994; Summerfield *et al.*, 1995; Ghiran *et al.*, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2003; Jack *et al.*, 2003), através dos quais a MBL se liga aos diferentes patógenos ou superfícies celulares. Para a completa atividade funcional da MBL, é necessário que ela esteja no mínimo na forma de tetrâmero e que os três domínios de ligação de lectina obedeçam a distâncias constantes (45Å) de separação entre si (Turner, 2003).



**Figura 1** - Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL madura (adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

O padrão de reconhecimento da MBL é definido através da conformação espacial e do sentido de orientação de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), determinando o tipo de ligante da proteína, que são microrganismos com padrões moleculares (PAMPs) com grande quantidade de manose e glicanos em sua superfície celular (Jack *et al.*, 2003).

Na superfície dos microrganismos, os resíduos de ligação para MBL estão dispostos em padrões de ordem repetitiva. Acredita-se que esta conformação molecular resulte em um alvo próprio para facilitar a ligação com a MBL, que apresenta distância entre seus sítios de cada subunidade com constância de 45Å; diferente dos padrões moleculares das células do hospedeiro, onde as glicoproteínas são limitadas e não ordenadas de forma repetitiva, apresentando ainda padrões moleculares com distância de 20 a 30 Å entre si (Jack *et al.*, 2001).



**Figura 2** - Estrutura da formação oligomérica da MBL (adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

Embora a afinidade de cada interação lectina-açúcar seja de apenas  $10^{-3}M$  (Iobst *et al.*, 1994), a oligomerização da MBL permite uma ávida ligação aos carboidratos, dada pela presença de múltiplos sítios que se ligam simultaneamente (Figura 2). Formas com menor grau de polimerização ligam-se com menos avidéz aos açúcares, além de apresentarem falhas na ativação do complemento (Chen & Wallis, 2001).

A ativação do complemento pela via das lectinas exige a ligação da MBL, através de sua região colagenosa, com diferentes proteases denominadas de: MASP-1, MASP-2, MASP-3 e a proteína de 19KDa, sMAp ou MAp19 (Turner, 1996; Peterson *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2001). A MBL circula no sangue associada a estas proteínas em um complexo em forma de zimogênio da serino protease MASP, apresentando a mesma estrutura modular de C1r:C1s. Esta via, de recente reconhecimento, decorreu da observação de que, microorganismos podiam ativar a via do complemento na ausência de anticorpos, independente da via alternativa. Quando a MBL se liga aos grupamentos de manose terminais presentes nos carboidratos bacterianos, por exemplo, a MASP1 e a MASP2 são

ativadas e continuam a ativar a cascata do sistema complemento, independente da presença do anticorpo. A MASP2 cliva C4 e C2, enquanto a MASP1 cliva C3 e C2 (Petersen *et al.*, 2001; Schwaeble *et al.*, 2002; Male, 2003; Prodinger, 2003; Janeway *et al.*, 2005). O componente efetor da via das lectinas é a MASP2, pois o complexo MBL-MASP2 é suficiente na ativação do complemento, sendo responsável pela ativação direta de C3, atuando como C3 convertase determinando, assim, uma “via diferenciada”, a via das lectinas, apesar de haver discordância quanto a este prognóstico, por parte de alguns autores (Schwaeble *et al.*, 2002).

A forma circulante da MBL é constituída por oligômeros estruturados por subunidades formadas pela associação de três cadeias polipeptídicas, idênticas, de 32 kDa. Cada cadeia polipeptídica é composta por um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), uma região hidrofóbica chamada de “flexão ou dobradiça”, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. As três cadeias interagem através de suas regiões colagenosas formando uma tripla hélice. A região hidrofóbica de cada cadeia adota uma forma espiralada e os domínios de reconhecimento de carboidratos apresentam características de proteínas globulares (Turner, 2003). O trímero é estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as regiões N-terminais ricas em cisteína de cada cadeia (Holmskov *et al.*, 1994) e associa-se em oligômeros de duas a seis subunidades formando uma estrutura quaternária com a aparência de um “buquê de tulipas”, cuja estrutura tridimensional assemelha-se ao do componente C1q do sistema complemento (Holmskov *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 2004).

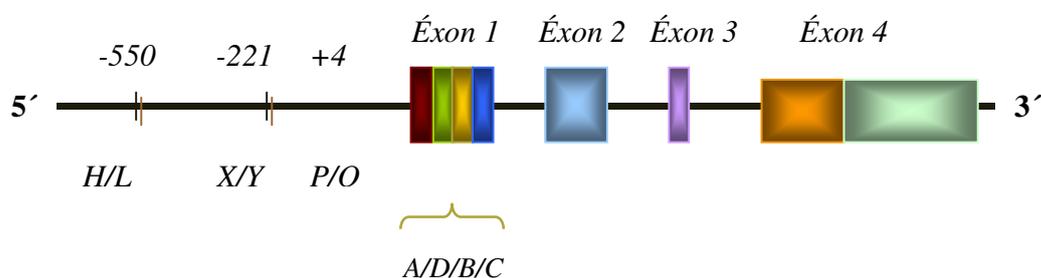
### 1.1.2 O Gene da MBL

A variação na concentração sérica da MBL é atribuída a ocorrência de mutações no exon 1 e na região promotora do gene da *MBL* (Figura 3). Este fato resulta em defeitos na polimerização, levando a deficiência funcional, além de influenciar o nível de expressão da proteína (Presanis *et al.*, 2003; Turner, 2003).

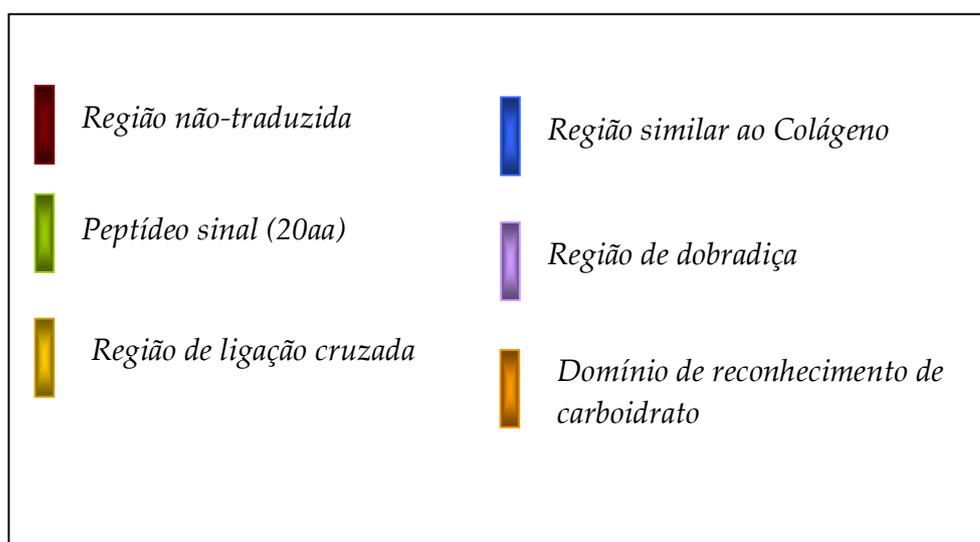
Os genes das colectinas humanas estão todos situados no cromossomo 10 (q21-24) (Holmskov *et al.*, 1994). O gene da *MBL* humana que codifica um produto protéico chamado *MBL-2* e compreende 4 exons e 3 íntrons (Figura 3). O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região colagenosa, enquanto o exon 2 codifica o restante da região colagenosa. O exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como pescoço e o exon 4 o DRC (Turner, 2003)

As mutações estruturais do exon 1 (Figura 4) compreendem trocas de bases nucleotídicas nos códons 52, 54 e 57 e são denominadas de variantes *MBL\* D* (arginina por cisteína ou CGT por TGT), *MBL\* B* (glicina por ácido aspártico ou GGC por GAC), *MBL\* C* (glicina por ácido glutâmico ou GGA por GAA), respectivamente. O alelo normal é chamado de *MBL\* A* (Lipscombe *et al.*, 1992; Madsen *et al.*, 1994; Garred *et al.*, 2003).

Indivíduos que são homozigotos para um alelo mutante (O/O, onde O pode ser B, C ou D) produzem quantidades de MBL no soro em concentrações indetectáveis por ELISA, enquanto os heterozigotos para a mutação (A/O) possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados com indivíduos homozigotos (A/A) para o alelo selvagem (Lipscombe *et al.*, 1992).

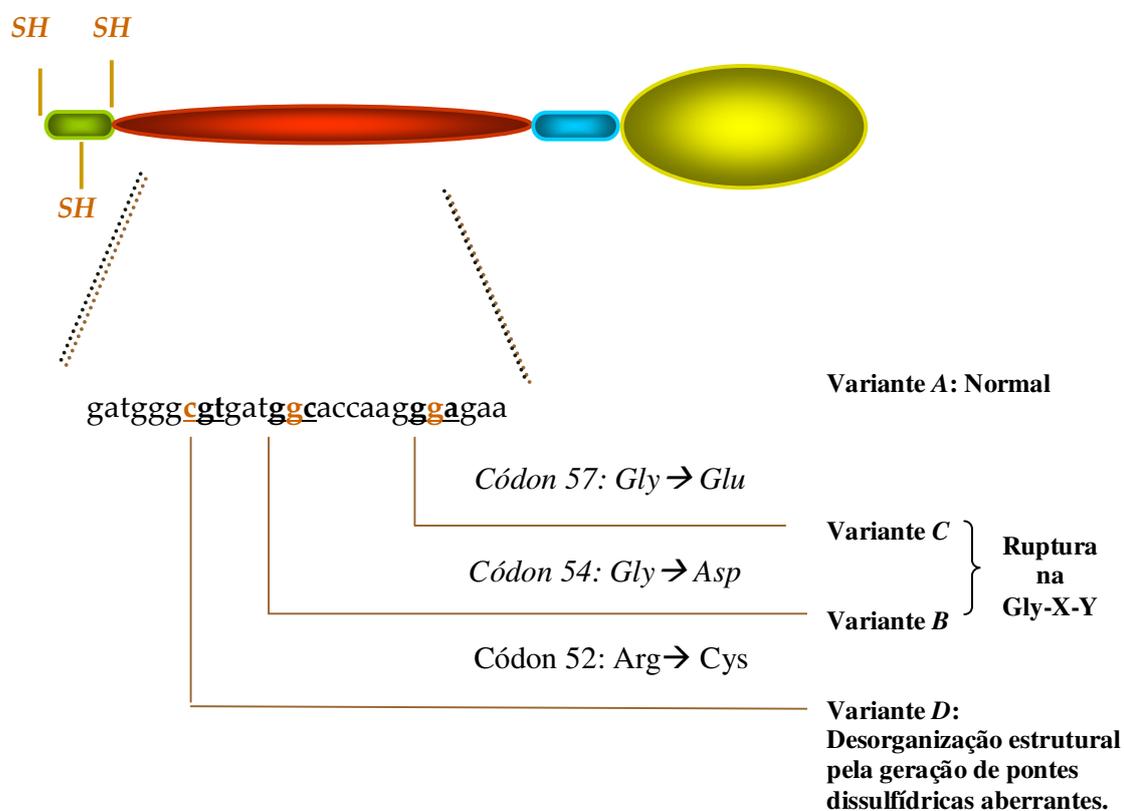


### LEGENDA



**Figura 3** – Representação esquemática do gene *MBL* demonstrando a ocorrência das mutações estruturais no exon 1 e funcionais na região promotora do gene (Adaptado de Kilpatrick, 2002).

Os sítios polimórficos da região promotora (Figura 3) estão nas posições -550, -221 e +4 do gene da *MBL* e representam os *loci* H/L, X/Y e P/Q, respectivamente (Madsen *et al.*, 1995). Estes três *loci* estão intimamente ligados e, devido ao desequilíbrio da ligação, apenas sete haplótipos (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) são comumente encontrados.



**Figura 4** - Esquema demonstrando três mutações no exon 1 do gene da *MBL* que geram três substituições de aminoácidos na região colagenosa (Adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

O haplótipo HYP está associado com concentrações plasmáticas normais e altas de MBL, enquanto que concentrações baixas são frequentemente associadas ao haplótipo LXP (Madsen *et al.*, 1998).

### 1.1.3 MBL nas Doenças

Vários estudos associam os níveis séricos de MBL à suscetibilidade ou resistência a agentes infecciosos. Super *et al.* (1989), observaram que a deficiência de MBL no soro de humanos era a base para o defeito na opsonização de microrganismos. Dois anos depois, Turner (1991) demonstrou que baixas concentrações da proteína estavam associadas a infecções recorrentes na infância. A partir daí, uma grande variedade de afecções clínicas tem sido associada à deficiência de MBL, tais como: a suscetibilidade aumentada para infecções bacterianas e virais (Eisen & Michinton, 2003), a aterosclerose (Rugonfalvi-Kiss *et al.*, 2002), leucemias (Schmiegelow *et al.*, 2002) e até abortos recorrentes (Christiansen *et al.*, 1999). Entretanto, altas concentrações de MBL podem favorecer a infecção por alguns parasitas intracelulares como a *Leishmania*, que utiliza a opsonização por C3 e seu receptor para entrar na célula do hospedeiro. Assim, mecanismos que diminuam a ativação do complemento, podem dificultar a entrada do parasita nas células (Bonar *et al.*, 2004).

A associação da deficiência de componentes da via clássica do complemento com doenças auto-imunes está bem estabelecida (Fike, 1997; Turner, 2003). Diversos estudos têm relacionado os valores baixos de MBL ou a frequência aumentada dos alelos mutantes em pacientes com doenças autoimunes (Lau *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1997), sugerindo que uma associação similar à da via clássica também possa ocorrer com a MBL e a via das lectinas. Uma relação da MBL com doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (Villarreal *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003), a colite ulcerativa, a doença de Crohn (Rector *et al.*, 2001; Seibold *et al.*, 2004), a artrite

reumatóide (Ip *et al.*, 2000) e a síndrome de Sjögrens (Tsutsumi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), entre outras, tem sido demonstrada por diferentes autores.

Tais associações corroboram a hipótese de que a proteína possui um importante papel na regulação da resposta imunológica envolvida nessas doenças. Ademais, baixas concentrações de MBL têm sido associadas a abortos espontâneos. Essa relação foi evidenciada em mulheres sadias e sugere uma resposta imune alterada no ambiente fetal como o responsável pela susceptibilidade aumentada ao aborto (Kilpatrick *et al.*, 1995; Christiansen *et al.*, 1999).

Alguns estudos sugerem que a MBL também é capaz de modular a gravidade de doenças infecciosas como a AIDS (Garred *et al.*, 1997; Mass *et al.*, 1998) e doenças auto-imunes como artrite reumatóide (Garred *et al.*, 2000; Graudal *et al.*, 2000; IP *et al.*, 2000). Altos valores séricos de MBL podem conferir, em certas circunstâncias, desvantagens biológicas (Ezerkowitz, 1998; Turner & Hamvas, 2000) por exacerbar a inflamação sistêmica e local através da ativação do complemento e produção de citocinas inflamatórias (Jack *et al.*, 2001; Fiane *et al.*, 2003).

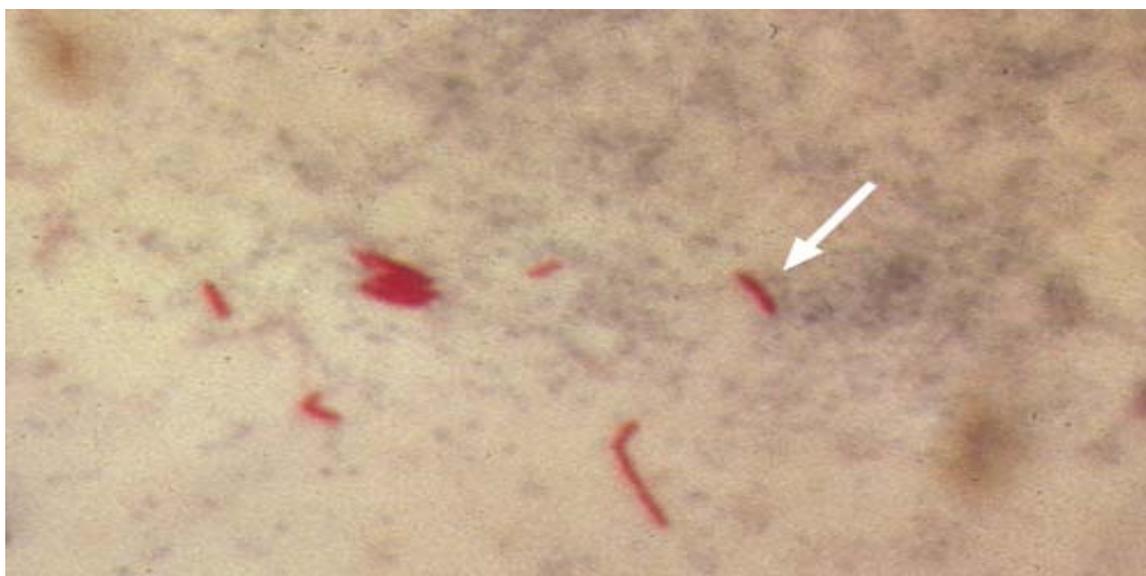
Diferentes autores demonstraram que altos valores de MBL podem estar envolvidos na patogênese da complicação micro e macrovascular no diabetes mellitus tipo 1 (Hansen *et al.*, 2004; Hovind *et al.*, 2005), da lesão cardíaca em pacientes com febre reumática (Shafranski *et al.*, 2004), na patogênese das manifestações renais da púrpura de Henoch-Schonlein (Endo *et al.*, 2000), na nefropatia por IgA (Endo *et al.*, 1998) e em outras formas de glomerulonefrites humanas (Lhotta *et al.*, 1999).

## 1.2 A TUBERCULOSE

O microrganismo responsável pela tuberculose humana, o *Mycobacterium tuberculosis* foi descoberto em 1882 por Robert Koch, que isolou e descreveu o bacilo, conseguindo o seu cultivo e reproduzindo a doença em animais de laboratório. Este bacilo se apresenta sob a forma de bastonetes retos ou ligeiramente encurvados (Figura 5), medindo de 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$  de largura por 2 - 4  $\mu\text{m}$  de comprimento, dispostos isoladamente, aos pares ou em pequenos grupos (Melo, 2002).

As micobactérias são relativamente resistentes aos procedimentos convencionais de coloração e quando coradas com carbol-fucsina não podem ser descoradas com ácido ou álcool, e assim, são classificadas como bacilo álcool – ácido resistente. Esta característica reflete a composição incomum da parede celular, que contém, grande quantidade de lipídios, que podem ser responsáveis pela resistência da micobactéria a estresses ambientais, como ressecamento (Tortora *et al.*, 2000). Todas as micobactérias expressam um único glicolípido no envelope celular, que é chamado Lipoarabinomanose, que é um fator de virulência em potencial que atua na moderação da resposta imune (Stronmeier & Fenton, 1999).

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre através de gotículas de aerossóis, provenientes de pacientes com doença em atividade, contendo microrganismos viáveis, que são inalados por pessoa susceptível à doença (Melo, 2002). O bacilo cresce lentamente e possui uma cápsula que o protege dos agentes químicos. É, porém, facilmente destruído por agentes físicos como: calor, raios ultravioleta da luz solar e radiações ionizantes.



**Figura 5** – Fotografia mostrando o *M.tuberculosis* (seta), visualização após coloração Ziehl-Neelsen (Fonte: <http://wikipedia.org/wiki/Tuberculose>)

O *M. tuberculosis* possui a capacidade de duplicar sua população em 18 a 48 horas, dependendo da maior ou menor oferta de oxigênio, do pH do meio e das facilidades de nutrientes. Esse crescimento lento do bacilo condiciona um curso lento e a evolução crônica para a doença. Fora do parasitismo, só consegue se desenvolver em meios de cultura que reproduzam as condições ambientais do hospedeiro, sendo aeróbio estrito, infectando os pulmões onde se localiza preferencialmente pela presença do oxigênio, o que facilita sua multiplicação e a transmissão em virtude da ligação do órgão com o meio externo (Melo, 2002).

### 1.2.1 Epidemiologia da Tuberculose

Nos últimos anos o número de casos de tuberculose recrudescceu em todo mundo, sendo uma das razões o advento da pandemia de AIDS, a alta correlação entre a doença e a pobreza e, mais recentemente, o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas (TBMR). A multiresistência é um fenômeno biológico considerado iatrogênico, ou seja, fruto de tratamento inadequado (Brasil, M.S., 2007). No Brasil, considera-se TBMR a situação no qual o paciente é resistente a rifampicina e a isoniazida e a um terceiro fármaco dos esquemas padronizados (Dalcolmo et al.; 2007).

O surgimento de cepas resistentes é preocupante, pois existem poucas drogas efetivas contra a tuberculose, o que tornaria a doença sem tratamento (Brasil, M.S., 2002). Hoje, a tuberculose é reconhecida como uma das três maiores doenças microbianas, responsável por 8 a 9 milhões de novos casos anuais, apresentando 1,5 a 2,5 milhões de morte/ano (Kaufmann & McMichael, 2005).

Nos países desenvolvidos, cerca de 40.000 mortes são devidas à tuberculose e mais de 400.000 casos novos são descobertos a cada ano (WHO, 2007). Nesses países, a tuberculose é mais freqüente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, atinge a todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (Rufino, 2002). Com o surgimento, em 1981, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), vem-se observando, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, um crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV), isto, apesar dos indicadores oficiais terem relatado o declínio da doença no último século, desde 1990 este declínio vem apresentando sinais de reversão (WHO, 2007). A associação (HIV/TB) constitui, nos dias atuais, um sério problema de saúde pública, podendo levar ao aumento da morbidade e mortalidade pela tuberculose (Rufino, 2002).

O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (WHO, 2007). Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos (correspondendo a um coeficiente de incidência de 47/ 100.000 habitantes) no Brasil (Brasil, M.S., 2005).

O Estado do Pará, considerado como área endêmica, registra em média, 3.000 novos casos de tuberculose por ano. A maioria encontra-se nos municípios de Altamira, Ananindeua, Belém, Breves, Itaituba, Marabá, Marituba, Paragominas, Redenção, Santarém e Tucuruí, que estão inseridos na lista de 315 municípios priorizados para o controle da tuberculose pelo Ministério da Saúde (SESPA, 2007).

Estudos de vigilância epidemiológica baseados na positividade de testes de hipersensibilidade tardia utilizando PPD (Derivado de Proteína Purificado) indicaram que um terço da população mundial é infectada com *M. tuberculosis*, demonstrando que nosso sistema imunológico é eficaz em conter o patógeno, mas não em erradicá-lo (Glickman & Jacobs, 2003), tornando-se imprescindível o conhecimento das diferentes estratégias moleculares desenvolvidas pelo *M. tuberculosis* que lhe conferem resistência às drogas

utilizadas, bem como, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas que possam detectar essas resistências (Furin & Johnson, 2005).

### 1.2.2 Diagnóstico da Tuberculose

A prova mais específica para o estabelecimento do diagnóstico da doença é o encontro do bacilo (Afiune, 1996). O método padrão para o diagnóstico da tuberculose é a demonstração dele na bacterioscopia de secreções ou no isolamento em cultura. A limitação principal da bacterioscopia é sua baixa sensibilidade; técnicas de cultura tradicionais em meios sólidos (Figura 6) são mais sensíveis que bacterioscopia de secreções, mas requerem até 2 meses para demonstrar a presença de *M. tuberculosis* (Brasil, M.S., 2005).



**Figura 6** - Colônias de *M. tuberculosis* em meio de cultura de Lowenstein Jansen

(Fonte:<http://wikipedia.org/wiki/Tuberculose>)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular, cuja escolha do DNA alvo e definição dos *primers* dentro da seqüência do DNA são fatores determinantes da sua acuidade. Ela vem sendo utilizada como alternativa de alta

sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. No estudo da tuberculose, essa técnica representa uma verdadeira revolução. Sua aplicação dá-se em qualquer área, desde a epidemiologia até a prevenção, mas é no diagnóstico que se faz sentir sua grande importância (García-Quintanilla *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Imunidade ao *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose é uma doença infecciosa bacteriana, onde podemos observar, no curso da infecção, a co-existência de imunidade protetora e hipersensibilidade patológica, em que as lesões são causadas principalmente pela resposta do hospedeiro, pois, o *M. tuberculosis* não produz nenhuma endo ou exotoxina conhecida (Abbas & Lichtman, 2005).

A infecção pelo *M. tuberculosis* pode ter três desfechos: controle na porta de entrada (graças à imunidade inata), doença ativa ou tuberculose latente. A maior parte dos indivíduos infectados não desenvolve qualquer sinal de doença em toda sua vida, mantendo uma infecção latente. Na tuberculose latente, a infecção é contida pelos macrófagos alveolares, o organismo controla, mas não elimina a infecção, os bacilos se multiplicam lentamente no pulmão e causam apenas inflamação moderada. O *M. tuberculosis* fica dormente, replicando intermitentemente e com metabolismo alterado. A infecção está sob controle, mas não eliminada. Isso gera um reservatório enorme de tuberculose (Silva *et al.*, 1995).

O diagnóstico dos indivíduos com infecção latente é importante, uma vez que estes apresentam risco de desenvolver a doença, principalmente se expostos a

condições que favorecem o desenvolvimento de micobactérias, como co-infecção com HIV ou ainda quando da utilização imunossupressores (Lotch et al., 2007).

Na doença ativa, a imunidade mediada por células é desenvolvida, cuja interação de linfócitos e monócitos culmina com a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, o *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver dentro dos macrófagos porque componentes de sua parede celular inibem a fusão dos lisossomas com os vacúolos fagocíticos (Flynn & Chan, 2001). Muitos componentes da resposta imune parecem ser necessários ou importantes na resposta protetora. Estes incluem células TCD4+ e TCD8+, citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  e ativação de macrófagos (Flynn & Chan, 2001).

A ativação contínua das células T, leva a formação de granulomas com necrose central, denominada necrose caseosa, que é causada por enzimas lisossomais e intermediários reativos do oxigênio. Acredita-se que a necrose sirva para eliminar macrófagos infectados e para promover um ambiente anóxico nos quais os bacilos não podem se dividir. Os granulomas caseosos e a fibrose que acompanham a inflamação granulomatosa são as causas principais de lesão tecidual e de doença clínica na tuberculose (Abbas & Lichtman, 2005).

#### 1.2.4 **A MBL na Tuberculose**

O *M. tuberculosis* é capaz de viver dentro de macrófagos transformando a fagocitose num processo vital para a sua própria sobrevivência. Faz isso subvertendo o processo anti-microbiano, usando os mecanismos que lhe permite a entrada no fagócito para, em vez de serem dominados e eliminados por este, utilizá-lo como célula hospedeira. Por isso, como exerce reduzida toxicidade para o hospedeiro, a patologia devida

diretamente à ação dos parasitas intracelulares é geralmente restrita, sendo mais importante a que é originada pela agressão citotóxica da própria resposta do organismo à infecção. Vários aspectos da fisiologia dos macrófagos justificam a preferência do bacilo da tuberculose pela localização intramacrofágica, por resguardá-lo de fatores com atividade anti-microbiana do sangue e fluídos extracelulares, como fatores do complemento e anticorpos (Silva *et al.*, 1995).

Assim, o processo de fagocitose representa o primeiro passo crítico na interação entre o *M. tuberculosis* e o fagócito, envolvendo proteínas ligantes microbianas e receptores da superfície do macrófago (Kang & Schesinger, 1998).

Vários genes específicos e seus produtos têm sido sugeridos por contribuir para a susceptibilidade ou a proteção contra *M. tuberculosis* entre eles: a proteína natural de resistência associada a macrófagos (Nrampl1), o Receptor de Vitamina D (VDR) e a Lectina Ligadora de Manose (MBL) (Soborg *et al.*, 2003).

O envolvimento da MBL na fagocitose e na ativação do complemento por patógenos com ação intracelular como *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania braziliensis*, evidenciam o papel opsonizante e ativador do complemento da MBL, diretamente na superfície de patógenos (Ambrósio & Messias-Reason, 2005). BONAR *et al.* (2005), evidenciaram, *in vitro*, que a fagocitose do *M. tuberculosis* é intensificada pela presença de MBL humana, sugerindo que, *in vivo*, a MBL facilitaria a entrada da bactéria no fagócito, estabelecendo a infecção.

Em um trabalho analisando indivíduos africanos, observou-se que a suscetibilidade a tuberculose parece estar aumentada nos indivíduos que apresentam o genótipo homozigoto para as mutações do gene da *MBL* (Sumiya *et al.*, 1991). Em outro

estudo foi levantada a hipótese de que as variantes alélicas do gene da MBL em heterozigose, e que codificam baixas concentrações séricas da proteína, estão associadas com proteção contra a tuberculose, enquanto que genótipos que codificam altas concentrações séricas de MBL e aqueles que conferem deficiência da proteína, não estão associados à proteção contra a doença (Soborg *et al.*, 2003). Níveis séricos elevados de MBL também foram relacionados com a patogênese da tuberculose e com uma relativa desvantagem em infecções micobacterianas (Bonar *et al.*, 2004).

Este estudo parte do princípio de que as variantes alélicas do MBL podem ter um papel direto na infecção pelo *M. tuberculosis*, especialmente nas diversas formas clínicas da doença. Ademais, considerando que até o presente não foi realizado nenhum estudo de associação entre MBL e tuberculose em populações brasileiras, justifica-se a necessidade da realização de estudos que possam contribuir para conhecimento do real impacto do polimorfismo do gene da *MBL* no prognóstico da infecção pelo *M. tuberculosis*.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre o polimorfismo no gene da Lectina Ligadora de Manose (MBL) nos pacientes portadores da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

i) Descrever as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* nas populações de pacientes com tuberculose e controle sem tuberculose;

ii) Descrever as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em indivíduos portadores de Tuberculose Pulmonar;

iii) Descrever as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em indivíduos portadores de Tuberculose Extra Pulmonar;

iv) Descrever as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em indivíduos portadores de Tuberculose Multirresistentes a Drogas;

v) Investigar a associação entre o polimorfismo no exon-1 do gene *MBL* com as diferentes formas clínicas da Tuberculose.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. COLETA E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

#### **2.1.1. Pacientes com Tuberculose**

O grupo foi composto por 167 indivíduos, soronegativos para HIV-1, portadores de tuberculose, diagnosticados de acordo com a classificação do CDC (*Centers for Disease Control and Prevetion*), atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), localizado na região metropolitana de Belém. Estes pacientes foram triados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital a partir das baciloscopias positivas no escarro e/ou no lavado brônquico e/ou cultura específica para *Mycobacterium tuberculosis*. Foram utilizadas as amostras de sangue coletadas durante o ano de 2006 e 2007, obtidas por demanda espontânea para os exames hematológicos de rotina, coletadas em sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante, sendo estocadas a -20°C e, posteriormente, encaminhadas para realização dos testes moleculares no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir de seus respectivos prontuários arquivados no Departamento Arquivo Médico (DEMA) do Hospital Universitário João de Barros Barreto, onde estão consolidadas as anotações relativas aos exames físicos, clínicos e laboratoriais.

Para efeito de comparação o grupo de pacientes foi subdividido de acordo com as formas clínicas da Tuberculose: Pacientes com Tuberculose Multirresistente a

Drogas (TBMR) com 34 indivíduos; Pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TBEP) com 34 indivíduos e Pacientes com Tuberculose Pulmonar (TBP) com 133 indivíduos.

### **2.1.2 Grupo Controle**

Este grupo foi constituído de 159 indivíduos, profissionais de saúde, de ambos os sexos, soronegativos para HIV-1, sem Tuberculose ativa, monitorados semestralmente por exames periódicos, que exercem atividade com exposição freqüente a ambientes onde se realiza tratamento de pacientes com Tuberculose.

Destes 159 indivíduos foram obtidas amostras de sangue durante os anos de 2006 e 2007, coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante. As amostras de plasma e de células foram separadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### **2.1.3 Comitê de Ética em Pesquisa**

O presente projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (protocolo nº 034/06 CEP-CCS/UFGPA), em obediência a resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das Diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Todos os pacientes e indivíduos do grupo controle foram informados sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento (anexo).

## 2.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.2.1 Extração do DNA

Foi utilizado o método de Fenol-Clorofórmio para extração de DNA total a partir dos leucócitos do sangue periférico. O procedimento ocorreu de acordo com as seguintes etapas:

- **LISE DE HEMÁCIAS (Solução A:** Cloreto de Amônio [1.0M], EDTA [0.1M], H<sub>2</sub>O destilada; **Solução B:** Bicarbonato de Amônio [1.0M], H<sub>2</sub>O destilada).

1. Em um tubo de 2 mL adicionar 300 µL de sangue e 900 µL de solução de lise de hemácias.
2. Agitar por inversão por 20 minutos.
3. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
4. Descartar o sobrenadante e acrescentar 900 µL de lise de hemácias novamente.
5. Agitar por inversão por 20 minutos.
6. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
7. Descartar o sobrenadante.

- **LISE DE LEUCÓCITOS** (Tris-HCl [100mM], EDTA [20mM], NaCl [200mM], SDS 0,5 %, H<sub>2</sub>O destilada).

1. Acrescentar ao *pellet* 500 µL de lise de leucócitos.

2. Agitar no vortex até dissolver o *pellet*.
3. Incubar em “banho Maria” (55°C) por 30 minutos.

**- PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS** (Acetato de Amônio [7,5M], H<sub>2</sub>O destilada).

1. Acrescentar 200 µL de Solução de Precipitação de Proteínas.
2. Agitar brevemente no vortex.
3. Levar ao banho maria (55°C) por 30 minutos.
4. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
5. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 ml limpo. (Descartar o tubo com o precipitado de proteínas).
6. Adicionar 500 µL de Fenol-Clorofórmio álcool isoamílico.
7. Agitar por inversão por 10 minutos.
8. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
9. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2mL limpo.
10. Acrescentar ao sobrenadante 1,5mL de Isopropanol (2-propanol).
11. Visualizar o *pellet* de DNA. (Verificar conforme a quantidade de DNA formado a quantidade de H<sub>2</sub>O para hidratá-lo).
12. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
13. Desprezar o sobrenadante.
14. Adicionar 200 µL de Etanol a 70% lavando a parede do tubo.
15. Desprezar o etanol e deixar secando até evaporar completamente o álcool.
16. Adicionar H<sub>2</sub>O para hidratá-lo.

### 2.2.2 Determinação dos Polimorfismos no Éxon 1

No presente trabalho foi utilizada a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação de 120 pb do exon -1 do gene MBL, a partir do DNA de indivíduos com baciloscopia positiva para tuberculose e de indivíduos controles com baciloscopia negativa. As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador *Mastercycler Personal, Eppendorf*.

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50 µL contendo 500 ng de DNA extraído, 235 µM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores envolvido nesta reação foi (mbIE01For) 5'-CATCAACGGCTTCCCAGGGCAAGATGGG-3' e (mbIE02) 5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3' (Madsen *et al.*, 1995; Tin *et al.*, 2005).

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, foram efetivados 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 58°C e 120 segundos a 72°C.

As identificações dos alelos *MBL\*A*, *MBL\*B*, *MBL\*C* e *MBL\*D* foram realizadas pela digestão enzimática do produto amplificado (120pb) usando-se as endonucleases de restrição *BanI*, *MboII* e *MwoI*. A *BanI* atua no códon 54 clivando o alelo *MBL\*A* em dois fragmentos (86 pb e 34 pb). A *MboII* cliva especificamente o alelo *MBL\*C* no códon 57 em dois fragmentos (77 pb e 43 pb) e a enzima *MwoI* atua no códon 52 clivando o alelo *MBL\*A* em dois fragmentos (92 pb e 28 pb) (Tin *et al.*, 2005).

Quanto as condições das digestões enzimáticas, as enzimas *BanI* e *MboII* atuam na temperatura de 37°C por um período de 3 horas e 30 minutos e 4 horas e 30 minutos, respectivamente. Com relação à *MwoI*, sua temperatura de ação foi de 60°C, por um período de 3 horas (Tin *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.1 Eletroforese

Os produtos da amplificação e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

### 2.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os cálculos do equilíbrio de Hardy-Weinberg e das frequências alélicas e genotípicas do gene da *MBL* no grupo de pacientes infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* foram efetuadas por meio do programa *Tools For Population Genetic Analyses* – TFPGA 1.3v (Miller, 1997).

A avaliação das associações entre a prevalência das mutações no gene *MBL*, os aspectos clínicos da infecção foi efetuada pelo teste de  $\chi^2$  usando-se o programa BIOSTAT 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

### 3. RESULTADOS

Na avaliação das frequências alélicas do éxon 1 do gene *MBL* (Tabela 1) foi possível observar a maior prevalência do alelo *MBL*\*A nos dois principais grupos analisados (pacientes com tuberculose com frequência de 0,707 e grupo controle com frequência de 0,723). Para o alelo *MBL*\*B foi verificada frequências de 0,228 nos pacientes com tuberculose e de 0,230 no grupo controle. O alelo *MBL*\*C, nos pacientes com tuberculose, apresentou frequência de 0,026 e frequência de 0,014 no grupo controle. Com relação ao alelo *MBL*\*D, foi observada uma frequência de 0,039 para pacientes com tuberculose e de 0,032 no grupo controle. A distribuição das frequências alélicas entre os grupos analisados foi muito parecida, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas.

Avaliando-se a distribuição alélica, foi demonstrado que a frequência do alelo *MBL*\*A foi predominante em ambos os grupos quando comparado o alelo *MBL*\*O (*O* representa qualquer uma das três variantes alélicas *B*, *C* e *D*), porém as diferenças não foram estatisticamente significativas como observado pelo valor de *p* (Tabela 1).

Foram evidenciados seis diferentes genótipos: *AA*, *AB*, *AC*, *AD*, *BC*, *BD*, nos grupos analisados (Tabela 2). O genótipo *AA*, foi o de maior frequência, tanto no grupo de pacientes com tuberculose – TB (0,611) como no grupo controle – GC (0,635), seguido respectivamente com valores decrescentes dos genótipos: *AB* (TB: 0,299; GC: 0,302); *AD* (TB: 0,048; GC: 0,038); *AC* (TB: 0,024; GC: 0,012); *BC* (TB: 0,012; GC: 0,006) e *BD* (TB: 0,006; GC: 0,006).

**Tabela 1** - Distribuição das frequências alélicas do gene *MBL* na população de pacientes com Tuberculose e Grupo Controle.

<b>Alelos</b>	<b>Pacientes TB n (%)</b>	<b>Controle n (%)</b>	$\chi^2$	<i>p</i>
<i>MBL *A</i>	<b>164 (70,68)</b>	<b>157 (72,35)</b>		
<i>MBL *O</i>	<b>68 (28,29)</b>	<b>60 (27,64)</b>		
<i>MBL *B</i>	53 (22,84)	50 (23,04)		
<i>MBL *C</i>	6 (2,58)	3 (1,38)		
<i>MBL *D</i>	9 (3,87)	7 (3,22)		
<b>Total</b>	<b>232 (100)</b>	<b>217 (100)</b>	<b>0,990</b>	<b>0,8037</b>

Outra forma de avaliação genotípica realizada para comparação entre os grupos considerou três genótipos: *AA*, *AO* e *OO*. Onde *A* é o alelo normal e *O* representa qualquer uma das três variantes alélicas (*B*, *C* e *D*). Observou-se por esta avaliação a maior frequência do genótipo *AA* em ambos os grupos TB e GC, com frequências de 0,611 e 0,635, respectivamente. O genótipo *AO* apresentou frequências de 0,371 no grupo TB e de 0,352 no GC. O genótipo *OO* (Homoziгоze para variantes alélicas) apresentou frequências de 0,018 no grupo TB e de 0,012 no GC (Tabela 2).

**Tabela 2** - Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose e no Grupo Controle.

<b>Genótipos</b>	<b>Pacientes TB <i>n</i> (%)</b>	<b>Controle <i>n</i> (%)</b>
<b>AA</b>	<b>102 (61,07)</b>	<b>101 (63,52)</b>
<b>AO</b>	<b>62 (37,12)</b>	<b>56 (35,22)</b>
<i>AB</i>	50 (29,94)	48 (30,18)
<i>AC</i>	4 (2,39)	2 (1,25)
<i>AD</i>	8 (4,79)	6 (3,77)
<b>OO</b>	<b>3 (1,79)</b>	<b>2 (1,25)</b>
<i>BC</i>	2 (1,19)	1 (0,62)
<i>BD</i>	1 (0,59)	1 (0,62)
<b>Total</b>	<b>167 (100)</b>	<b>159 (100)</b>

As similaridades nos resultados evidenciadas pelos valores numéricos indicaram não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos correlacionados (Tabela 2).

Vale ressaltar que na análise das distribuições genótípicas foi verificada concordância ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir dos desvios entre as proporções genótípicas observadas e as esperadas em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ).

Quando comparamos às frequências genótípicas do grupo de pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TEP) com aquelas do Grupo Controle (GC), o genótipo AA apresentou frequências de 52,94% e de 63,52%, respectivamente. Para o genótipo AB, a

maior frequência foi observada para os pacientes com tuberculose extra pulmonar (44,11%), quando comparado ao grupo controle (30,18%). Os genótipos *AC*, *AD* e *BD*, não foram observados nos pacientes com TEP, sendo observados em baixas frequências no GC. O genótipo *BC* esteve presente em ambos os grupos com baixa frequência (Tabela 3).

**Tabela 3** - Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TEP) e no Grupo Controle (GC).

<b>Genótipos</b>	<b>TB Extra pulmonar n (%)</b>	<b>Controle n (%)</b>
<b>AA</b>	<b>18 (52,94)</b>	<b>101 (63,52)</b>
<b>AO</b>	<b>15 (44,11)</b>	<b>56 (35,22)</b>
<i>AB</i>	15 (44,11)	48 (30,18)
<i>AC</i>	-	2 (1,25)
<i>AD</i>	-	6 (3,77)
<b>OO</b>	<b>01 (2,94)</b>	<b>2 (1,25)</b>
<i>BC</i>	1 (2,94)	1 (0,62)
<i>BD</i>	-	1 (0,62)
<b>Total</b>	<b>34 (100)</b>	<b>159 (100)</b>

Quando da análise dos genótipos agrupados na correlação dos grupos TEP e GC, vale salientar que o genótipo *AO* foi mais frequente no grupo TEP (44,11%), do que no GC (35,22%), o mesmo acontecendo para o genótipo *OO* (Tabela 3).

A frequência alélica individualizada demonstrou predomínio do alelo *A* nos grupos de pacientes com tuberculose extra pulmonar e grupo controle quando relacionados com alelo *O*, porém não foram demonstradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Distribuição das frequências alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Extra Pulmonar (TEP) e no Grupo Controle (GC).

<b>Alelos</b>	<b>TB Extra pulmonar <i>n</i> (%)</b>	<b>Controle <i>n</i> (%)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>
<i>A</i>	51 (75,00)	258 (81,13)		
<i>O</i>	17 (23,00)	60 (18,86)		
<b>Total</b>	<b>68 (100)</b>	<b>318 (100)</b>	<b>1,319</b>	<b>0,2507</b>

Nas tabelas 5 e 6 foram correlacionados os dados dos pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Grupo Controle (GC), onde a presença dos mesmos genótipos foram verificados em ambos os grupos (*AA*, *AB*, *AC*, *AD*, *BC* e *BD*), destacando-se o genótipo *AB* com frequência maior no grupo controle (30,18%) do que nos pacientes com tuberculose pulmonar (26,31%), e os genótipos *AC* e *AD* que apresentaram, nos pacientes com TP aproximadamente o dobro das frequências observadas no GC (Tabela 5).

**Tabela 5** - Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar e Grupo Controle.

<b>Genótipos</b>	<b>TB Pulmonar <i>n</i> (%)</b>	<b>Controle <i>n</i> (%)</b>
<b>AA</b>	<b>84 (63,15)</b>	<b>101 (63,52)</b>
<b>AO</b>	<b>47 (35,33)</b>	<b>56 (35,22)</b>
<i>AB</i>	35 (26,31)	48 (30,18)
<i>AC</i>	4 (3,00)	2 (1,25)
<i>AD</i>	8 (6,01)	6 (3,77)
<b>OO</b>	<b>2 (1,50)</b>	<b>2 (1,25)</b>
<i>BC</i>	1 (0,75)	1 (0,62)
<i>BD</i>	1 (0,75)	1 (0,62)
<b>Total</b>	<b>133 (100)</b>	<b>159 (100)</b>

Na avaliação genotípica considerando os genótipos: *AA*, *AO* e *OO* (Tabela 5), foram observados os mesmos valores absolutos de frequências em ambos os grupos, não se destacando nenhuma prevalência genotípica individual a considerar.

Quando da avaliação alélica unitária, as prevalências nos dois grupos, apresentam similaridade nas frequências tanto para o alelo *A* como para o alelo *O* (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição das freqüências alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Grupo Controle (GC).

<b>Alelos</b>	<b>TB Pulmonar n (%)</b>	<b>Controle n (%)</b>	$\chi^2$	<i>p</i>
A	215 (80,82)	258 (81,13)		
O	51 (19,17)	60 (18,86)		
<b>Total</b>	<b>266 (100)</b>	<b>318 (100)</b>	<b>0,009</b>	<b>0,9255</b>

As tabelas 7 e 8, correlacionam os grupos de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Tuberculose Extra Pulmonar (TEP), onde o genótipo AA apareceu com maior prevalência em ambos os grupos, porém sendo predominantemente maior no grupo TP (63,15%), do que no TEP (52,94%). O genótipo AB foi o segundo maior em prevalência em ambos os grupos, porém sendo percentualmente maior na TEP (44,11%), do que na TP (26,31%). Os genótipos AC e AD, só foram observados na TP (AC: 3,00%; AD: 6,00%), não ocorrendo no grupo de TEP (Tabela 7).

Quando comparamos as freqüências genotípicas agrupadas entre os pacientes com TP e TEP (Tabela 7), os genótipos AA e AO, foram os mais freqüentes em ambos os grupos, com percentuais mais elevados no grupo TP (63,15%) do que no TEP (52,94%), porém observamos a inversão no genótipo AO, com valor maior para TEP (44,11%), do que na TP (35,33%).

**Tabela 7** - Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Tuberculose Extra pulmonar (TEP).

<b>Genótipos</b>	<b>TB Pulmonar <i>n</i> (%)</b>	<b>TB Extra pulmonar <i>n</i> (%)</b>
<b>AA</b>	<b>84 (63,15)</b>	<b>18 (52,94)</b>
<b>AO</b>	<b>47 (35,33)</b>	<b>15 (44,11)</b>
<i>AB</i>	35 (26,31)	15 (44,11)
<i>AC</i>	4 (3,00)	-
<i>AD</i>	8 (6,01)	-
<b>OO</b>	<b>2 (1,50)</b>	<b>01 (2,94)</b>
<i>BC</i>	1 (0,75)	1 (2,94)
<i>BD</i>	1 (0,75)	-
<b>Total</b>	<b>133 (100)</b>	<b>34 (100)</b>

Avaliando-se os resultados das distribuições alélicas (Tabela 8), foi observado que o alelo *A* predominou percentualmente na TP (80,82%), contra (75,00%) de TEP, observando-se o predomínio do alelo *O*, no grupo TEP (23,00%) em comparação ao TP (19,57%), não resultando, porém, em diferenças significativas nas análises estatísticas aplicadas.

**Tabela 8** - Distribuição das frequências alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Pulmonar (TP) e Tuberculose Extra pulmonar (TEP).

<b>Alelos</b>	<b>TB Pulmonar <i>n</i> (%)</b>	<b>TB Extra pulmonar <i>n</i> (%)</b>	$\chi^2$	<i>p</i>
<i>A</i>	215 (80,82)	51 (75,00)		
<i>O</i>	51 (19,17)	17 (23,00)		
<b>Total</b>	<b>266 (100)</b>	<b>68 (100)</b>	<b>1,134</b>	<b>0,3701</b>

Quando consideramos a pesquisa das frequências genotípicas no grupo de pacientes TBMR correlacionando ao GC, obtivemos uma maior prevalência do genótipo *AA* em ambos os grupos.

O genótipo *AA* apresentou frequências de 63,52% no grupo controle e de 61,76% no grupo TBMR. Predomínio do genótipo *AB* também foi observado no GC (30,18%) quando comparado ao grupo de TBMR (23,52%) (Tabela 9).

Nestes grupos o genótipo *AD* foi o que apresentou a terceira maior frequência (Tabela 9), com valores mais significativos no grupo TBMR (11,76%) do que no GC (3,77%).

**Tabela 9** - Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMR) e Grupo Controle (GC).

<b>Genótipos</b>	<b>TBMR n (%)</b>	<b>Controle n (%)</b>
<b>AA</b>	<b>21 (61,76)</b>	<b>101 (63,52)</b>
<b>AO</b>	<b>12 (35,29)</b>	<b>56 (35,22)</b>
<i>AB</i>	8 (23,52)	48 (30,18)
<i>AC</i>	-	2 (1,25)
<i>AD</i>	4 (11,76)	6 (3,77)
<b>OO</b>	<b>1 (2,94)</b>	<b>2 (1,25)</b>
<i>BC</i>	-	1 (0,62)
<i>BD</i>	1 (2,94)	1 (0,62)
<b>Total</b>	<b>34 (100)</b>	<b>159 (100)</b>

Na avaliação genotípica realizada para comparação entre os grupos considerando os genótipos: *AA*, *AO* e *OO*, foi observada, também, uma maior prevalência do genótipo *AA* em ambos os grupos TBMR e GC, com frequências de 0,618 e 0,635, respectivamente. O genótipo *AO* apresentou frequências de 0,353 no grupo TBMR e de 0,352 no GC. No genótipo *OO* as frequências foram de 0,029 para o Grupo de TBMR e de 0,012 para o GC, observando-se uma tendência de maior frequência no Grupo de TBMR, porém, sem que as diferenças fossem estatisticamente significantes (Tabela 9).

**Tabela 10** - Distribuição das frequências Alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMR) e Grupo Controle (GC).

Alelos	TBMR <i>n</i> (%)	Controle <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
A	54 (79,41)	258 (81,13)		
O	14 (20,58)	60 (18,86)		
<b>Total</b>	<b>68 (100)</b>	<b>318 (100)</b>	<b>0,107</b>	<b>0,7436</b>

Os resultados das distribuições alélicas unitárias indicaram que o alelo A teve maior predomínio nos indivíduos do grupo controle (81,13%) contra (79,41%) do grupo com TBMR, invertendo-se estes valores para o alelo O, onde a maior prevalência foi observada no grupo com TBMR (20,58%), em comparação ao grupo controle (18,86%), não resultando, porém, em diferenças significativas nas análises estatísticas aplicadas (Tabela 10).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo a distribuição das formas alélicas e genotípicas do éxon 1 do gene *MBL* em pacientes com tuberculose e grupo controle, apresentou semelhança nas distribuições de frequências descrita em outros estudos, em que há o predomínio da frequência alélica *MBL* \*A, seguida de ocorrência decrescente das formas alélicas *MBL* \*B, *MBL* \*D e *MBL* \*C, como visto em populações chinesas (Liu *et al*, 2006), japonesas (Matsushita *et al*, 1998), australianas (Turner *et al*, 2000), brasileiras (Vallinoto *et al*, 2006), e em várias outras populações (Garcia-Laorden *et al*, 2006), Estes resultados já eram

esperados, pois corroboram com estudos populacionais onde foram definidas estas tendências de distribuição alélica, que são reflexo de fatores como taxa de mutações, migração humana e pressão ambiental, atuando sobre a dinâmica gênica das populações (Casanova & Abel; 2004).

Os efeitos da mutação no éxon 1 do gene *MBL*, acredita-se, pode produzir oligomerizações únicas que direcionariam para uma deficiência funcional sobre a produção contínua da proteína com a formação de baixos níveis de MBL sérica (Madsen *et al*, 1998).

Poucos estudos têm examinado a deficiência de MBL associada com a susceptibilidade à tuberculose (Berrington & Hawn, 2007), e os dados até hoje publicados, indicam a existência de um paradoxo quanto a atividade desta proteína em relação à susceptibilidade para esta doença (Dommett *et al*, 2006).

Soborg *et al*. (2003), avaliando o polimorfismo do gene da *MBL* em pacientes com tuberculose clínica, destacou que o decréscimo dos níveis séricos de MBL é freqüente em diferentes populações, estando as variações alélicas associadas ao aumento do risco e/ou severidade de diferentes tipos de infecção (Summerfield *et al*, 1997; Garred *et al*, 1997).

Nossa avaliação das mutações polimórficas no éxon 1 do gen *MBL*, não encontrou diferença significativa entre o grupo de pacientes com tuberculose e o grupo controle que indicasse estar relacionado a alterações na susceptibilidade à tuberculose.

Em indianos, estudos demonstraram que a deficiência de MBL está associada ao aumento da susceptibilidade à tuberculose, e na África do Sul e na Tanzânia estudos sugerem uma resistência à tuberculose para estas populações (Hoal-Van Helden *et al*, 1999; Garred *et al*, 1997) .

Na Dinamarca, resultados contraditórios foram observados, dependendo do nível de deficiência na produção desta lecitina, com um suave efeito protetor quando da mutação no códon 57 (MBL\*C), não observado para outros alelos (Soborg *et al*, 2003).

Dahl *et al.* (2004), estudando os níveis séricos e o perfil genotípico da MBL em 9245 indivíduos, observaram ausência de correlação entre a deficiência desta proteína com risco de infecção ou morbidade aumentada para outras doenças.

A heterogeneidade dos dados referentes a susceptibilidade à tuberculose por deficiência de produção de MBL sérica, relacionada ao polimorfismo genético desta proteína, pode ser devido ao fato de o *Mycobacterium tuberculosis* ser uma bactéria intracelular facultativa, que sofre ação do sistema imune inato, somente quando exposta ao ambiente extracelular, onde uma série de receptores de superfície dos fagócitos ativados pelo complemento, como os receptores de manose, o *scanvanger* e os Toll-like, e que participam da ativação dessas células fagocitárias, as quais secretam citocinas induzindo a infiltração de leucócitos, caracterizando o processo inflamatório (Abbas & Lichtman, 2005), compensando desta forma uma possível deficiência de MBL.

Fato importante a ressaltar, e que a grande maioria dos estudos relaciona a tuberculose com co-infecções, principalmente com o *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV) (Mombo *et al*, 2003; Garcia-Laorden *et al*, 2006; Alagarasus *et al*, 2007), quando da avaliação desta patologia com a variação alélica da *MBL*, diferindo de nossa pesquisa, que usou a sorologia positiva para HIV como critério de exclusão para seleção dos participantes. Assim, os resultados de associação encontrados em outros estudos, podem ser em razão da infecção pelo HIV-1 estar associada ao polimorfismo do gene *MBL*, como esta

amplamente descrito (Vallinoto et al, 2006), ao invés de ser em decorrência da relação entre a variabilidade genética da MBL e a infecção pelo *M. tuberculosis*.

Nosso estudo levou em consideração, para efeito de análise, a estratificação da população de pacientes doentes com tuberculose, separando-os pelas características patológicas em Tuberculose pulmonar (TBP) e Tuberculose extra pulmonar (TBEP).

A doença pulmonar é a forma mais comum da tuberculose em áreas onde a tuberculose continua a ser comumente transmitida. Em áreas onde há predomínio de casos de reativação, a distribuição parece ser completamente diferente com alta proporção de tuberculose extra pulmonar (Barker, 2008).

No presente estudo a análise da variação polimórfica do éxon 1 do gene *MBL* em pacientes com tuberculose pulmonar e tuberculose extra pulmonar, quando relacionados entre si e ao grupo controle não demonstrou diferenças significativas.

Estudo recente publicado por Sevaraj *et al.* (2006), avaliando pacientes do sul da Índia, co-infectados com HIV-1 e *Mycobacterium tuberculosis*, encontrou resultados significativos para o genótipo AA em pacientes com HIV e tuberculose extra pulmonar, sugerindo que o genótipo AA possa estar associado à susceptibilidade para tuberculose extra pulmonar em pacientes infectados com HIV-1, ressalta-se que neste trabalho não houve diferenças nas frequências genotípicas quando avaliados pacientes infectados com HIV e não infectados para tuberculose.

Cosar *et al.* em (2009), analisando as frequências alélicas e genotípica da MBL em crianças turcas, com diferentes formas clínicas de tuberculose, observaram decréscimo significativo nas frequências do genótipo AB e do alelo B, em pacientes com

Tuberculose extra pulmonar, não encontrando diferenças estatísticas quando relacionou os pacientes com tuberculose pulmonar ao controle saudável.

Em nosso estudo não observamos diferenças entre os grupos de pacientes com tuberculose pulmonar e tuberculose extra pulmonar quando relacionados entre si e ao grupo controle saudável. Vale ressaltar que a tuberculose é predominantemente uma doença pulmonar (80% dos casos no Brasil), sendo que o bacilo pode direcionar-se para corrente sanguínea e infiltrar outros órgãos, causando a doença extra pulmonar que cursa com resposta adquirida do sistema imune (Teixeira *et al*, 2007). Esta segunda linha de defesa é mediada por células, e as ações dos macrófagos previamente ativados tendem a destruir o bacilo, sendo que os antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* ativam os linfócito T que secretam citocinas (quimiocinas), que atraem os macrófagos ao sítio de infecção e os ativam para eliminar as micobactérias (Rosemberg, 2001).

Como observamos o mecanismo imunitário da tuberculose encerra grande complexidade de interações celulares e, apesar do conhecimento acumulado sobre eles associado à patogênese da doença, não há uma completa compreensão sobre os mecanismos de sinalização, as respostas transcricionais do hospedeiro e a adaptação da bactéria ao hospedeiro (Pinheiro *et al*, 2008), validando desta forma nosso intuito de avaliar mecanismos imunológicos associados à infecção ou a resistência desta doença.

Outra avaliação realizada no presente estudo diz respeito a um grupo estratificado de pacientes com Tuberculose Multi Drogas Resistentes (TBMR), que não apresentaram variações alélicas significativas para as variantes do éxon 1 do gene *MBL*, quando correlacionados com o grupo controle.

A TBMR reflete de forma preponderante não a susceptibilidade do hospedeiro e sim a característica do patógeno frente às drogas utilizada no tratamento, e, apesar da MBL estar ligada a imunidade do hospedeiro, existem estudos que indicam uma resposta diminuída do sistema imune do hospedeiro aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* por portadores da TBMR, como nos estudos de Shahemabadi *et al.* (2007), que observaram que a interleucina-10 em resposta aos antígenos lipídeos estava aumentado nos pacientes TBMR.

No Brasil, estudos demonstraram que pacientes com TBMR, apresentaram baixa produção de interferon gama, em resposta a proteína do *Mycobacterium tuberculosis*, quando comparados a pacientes com tuberculose não resistente, antes e após tratamento (Fortes *et al.*, 2005). Esses dados demonstram que a compreensão do mecanismo imunológico envolvido nas diferentes formas clínicas e temporais da tuberculose envolve uma série de fatores estando, sem dúvida, o genético entre eles. Daí a razão de se pesquisar a ação do polimorfismo da MBL neste grupo de pacientes.

Como observamos, os dados obtidos em nosso estudo não demonstraram evidências de qualquer influencia das variações do éxon 1 do gene *MBL* na tuberculose ativa, sugerindo que somente a seqüência polimórfica desta região tem pouca influencia na doença.

Ressalta-se que atualmente vários estudos tem utilizado uma série de avaliações concomitante com as variantes do éxon 1, como análise da variantes alélicas da região promotora, a quantificação sérica da MBL, onde foram obtidos resultados significativos em algumas populações (Soborg *et al.*, 2003; Severaj *et al.*, 2006).

A variabilidade dos resultados pode ser atribuída a vários fatores incluindo a etnia populacional, a falta de definição dos casos controles, o pequeno tamanho amostral e a genotipagem incompleta (Berrington & Hawn, 2007). Além de que, a imunidade antituberculose não resulta de ação específica direta e precisa contra o *Mycobacterium tuberculosis*, o ataque a este constitui processo de grande complexidade, variando sob ação de circunstâncias diferentes, nem todas bem definidas e com intervenção de múltiplos elementos (Rosemberg, 2001), daí a importância de estudos em região endêmica como a nossa, que aliem pesquisa genética e imunológica, permitindo esclarecer mecanismos, e iluminar substancialmente o entendimento da regulação genética da MBL, na susceptibilidade do hospedeiro para tuberculose.

## **5. CONCLUSÕES**

(i) As análises das distribuições das frequências alélicas e genotípicas do éxon 1 do gene *MBL* na população estudada não mostraram diferenças estatisticamente

significativas, o que sugere a ausência de associação entre os polimorfismos do éxon 1 e a susceptibilidade à Tuberculose.

(ii) As distribuições alélicas e genóticas do éxon 1 do gene *MBL* na população estudada não foram associadas a influencia específica na Tuberculose Pulmonar e Extra Pulmonar, sugerindo que as variantes alélicas não atuam nesta forma de tuberculose.

(iii) As distribuições alélicas e genóticas do éxon 1 do gene *MBL* na população estudada não foram associadas a influencia específica na Tuberculose de Pacientes Multiresistente a Drogas, sugerindo que as variantes alélicas não influenciam esta forma de tuberculose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.580p.
- AFIUNE, J. B. **Tratado de Infectologia**, Ed. Ricardo Veronesi, Roberto Focaccia, São Paulo, 1996.
- ALAGARASU, K., SELVARAJ, P., SWAMINATHAN, S., RAGHAVAN, S., NARENDRAN, G., NARAYANAN, P. R. Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India. **Tuberculosis**, **87(6)**: 535-43, 2007.
- AMBROSIO, A. R., MESSIAS-REASON, I. J. Leishmania (Viannia) braziliensis: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defense mechanism. **Parasite Immunology**, **27**, (9): 333-340, 2005.
- AYRES, M., AYRES, J. R., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. **BIOSTAT 5.0: Aplicação estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus, **Sociedade Civil Mamirauá**, 193p, 2007.
- BARKER, R. D. Clinical tuberculosis. **Medicine**, **36**: 300-305, 2008.
- BERRINGTON, W. R., HAWN, T. R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter ? **Immunological Reviews**, **219**: (1), 167 – 186, 2007.
- BONAR, A., CHMIELA, M., ROZALSKA, B. Level of mannose-binding lectin (MBL) in patients with tuberculosis. **Pneumonologia Polska**, **72**: (5-6), 201-205, 2004.

- BONAR, A., CHMIELA, M., RUDNICKA, W. *et al.* Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, **53**: (5), 437-441, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 5ª edição. Brasília:MS, p. 18, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6ª edição. Brasília:MS, p. 738, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Situação da doença tuberculose no Brasil**. Disponível em: < [http:// portal.saude. gov.br /portal /saude/area](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area)>. Acesso em 05/10/2007.
- CASANOVA J. L., ABEL, L. Human Mannose-binding Lectin in Immunity : Friend, Foe, or Both? **Journal of Experimental Medicine**, **199**, (10): 1295-1299, 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-U.S. **Department of Health and Human Services, Division of Tuberculosis Elimination**. Atlanta, Geórgia. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. 2008.
- CHEN, C. B., WALLIS, R. Stoichiometry of complexes between mannose binding protein and its associated serine proteases. Defining functional units for complement activation. **Journal of Biological Chemistry**, **276**, (28): 25894-25902, 2001.
- CHRISTIANSEN. O.B., KILPATRICK, D.C., SOUTER, V., VARMING, K., THIEL, S. Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. **Scandinavian Journal Immunology**, **49**, (2): 193- 196. 1999.
- COSAR, H., OZKINAY, F., ONAY, H., BAYRAM, N., BAKILER, A. R., ANIL, M., CAN, D., ÖZKINAY, C. Low levels of mannose-binding lectin confers protection

- against tuberculosis in Turkish children. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **27**: 1165-1169, 2009.
- DAHL, M., TYBJAERG-HANSEN, A., SCHNOHR, P., NORDESTGAARD, B. G. A population-based study of morbidity and mortality in mannose binding lectin deficiency. **Journal of Experimental Medicine**, **199**: 1391-1399, 2004.
- DALCOLMO, M. P. ANDRADE, M. K., PICON, P. D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. **Revista de Saúde Pública**, **41**: 34-42, 2007.
- DAVIES, E. J., TEH, L. S., ORDI-ROS, J., SNOWDEN, N., HILLARBY, M. C., HAJEER, A., DONN, R., PEREZ-PEMEN, P., VILARDELL-TARRES, M., OLLIER, W. E. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. **Journal of Rheumatology**, **24**: 485-488, 1997.
- DOMMETT, R. M., KLEIN, N., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, **68**: 193–209, 2006.
- EISEN, D. P., MICHINTON, R. M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, **37**: 1496-1505, 2003.
- ENDO, M., Ohi, H., OHSAWA, I., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, **13**, (8):1984-1990, 1998.

- ENDO, M., Ohi, H., OHSAWA, I., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis. **American Journal of Kidney Disease**, **35**, (3): 401-407, 2000.
- EZERKOWITZ, R. A. Genetic heterogeneity of mannose-binding proteins: the Jekyll and Hyde of innate immunity? **American Journal of Human Genetics**, **62**: 6-9, 1998.
- FEARON, D. T., LOCKEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, **272**: 50-53, 1996.
- FIANE, A. E., VIDEM, V., LINGAAS, P. S., HEGGELUND, L., NIELSEN, E. W., GEIRAN, O. R., FUNG, M., MOLLNES, T. E. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response alter thoraco abdominal aortic aneurysm repair. **Circulation**, **108**: 849-856, 2003.
- FIKE, D. J. Non organ-specific autoimmune disease. In: SHEEHAN, C. **Clinical Immunology. Principles and Laboratory Diagnosis**, **2**: 283-296, 1997.
- FLYNN, J. L., CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review Immunology**, **19**: 93-129, 2001.
- FORTES, A., PEREIRA, K., ANTAS, P. R. Z., FRANKEN, C. L. M. C., DALCOLMO M, RIBEIRO-CARVALHO, M. M., CUNHA, K. S., GELUK, A., KRITSKI, A., KOLK, A., KLATSER, P., SARNO, E. N., T OTTENHOFF, H. M., SAMPAIO, E. P. Detection of in vitro interferongamma and serum tumour necrosis factor-alpha in multidrug-resistant tuberculosis patients. **Clinical and Experimental Immunology**, **141**: 541-548, 2005.
- FURIN J. J., JOHNSON L. J. Recent Advances in the Diagnosis and Management of Tuberculosis, **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, **11**, (3): 189-194, 2005.

- GARCIA-LAORDEN, M.I., PENA, M.J., CAMINERO, J.A., GARCIA-SAAVEDRA, A., CAMPOS-HERRERO, M.I., CABALLERO, A., RODRÍGUEZ-GALLEGO, C. Influence of mannose-binding lectin on HIV infection and tuberculosis in a Western-European population. **Molecular Immunology**, **43**: 2143-2150, 2006.
- GARCIA-QUINTANILLA, A., GONZALEZ-MARTIN, J., TUDO, G., ESPASA, M., JIMENEZ DE ANTA, M. T. Simultaneous Identification of Mycobacterium Genus and Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples by 5'-Exonuclease Fluorogenic PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 40: 4646-4651, 2002.
- GARRED, P., THIEL, S., MADSEN, H. O., RYDER, L. P., JENSENIUS, J. C., SVEJGAARD, A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. **Clinical and Experimental Immunology**, **90**: 517–521, 1992.
- GARRED, P., MADSEN, H. O., BALSLEV, U., HOFMANN, B., PEDERSEN, C., GERSTOFT, J., SVEJGAARD, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannosebinding lectin. **Lancet**, **349**: 236–240, 1997.
- GARRED, P., MADSEN, H. O., MARQUART, H., HANSEN, T. M., SORENSEN, S. F., PETERSEN, J., VOLCK, B., SVEJGAARD, A., GRAUDAL, N. A., RUDD, P. M., DWEK, R. A., SIM, R. B., ANDERSEN, V. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **Journal of Rheumatology**, **27**: 26-34, 2000.
- GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H. O., KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency – revisited. **Molecular Immunology**, **40**, (2-4): 73-84, 2003.

- GHIRAN, I., BARBASHOV, S. F., KLINKSTEIN, L. B., TAS, S. W., JENSENIUS, J. C., NICHOLSON-WELLER, A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannanbinding lectin. **Journal of Experimental Medicine**, **192**: 1797- 1807, 2000.
- GLICKMAN M. S., JACOBS W. R. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. **Cell**, **104**: 477, 2003.
- GRAUDAL, N. A., MADSEN, H. O., TARP, U., SVEJGAARD, A., RUDD, P. M., DWEK, R. A., SIM, R. B., ANDERSEN, V., JURIK, A. G., GRAUDAL, H. K., GARRED, P. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, **43**: 515-521, 2000.
- HANSEN, T. K., TARNOW, L., THIEL, S., STEFFENSEN, R., STEHOUWER. C. D., SCHALKWIJK, C. G., PARVING, H., FLYVBJERG, A. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. **Diabetes**, **53**, (6): 1570- 1576, 2004.
- HOAL-VAN HELDEN, E.G., EPSTEIN, J., VICTOR, T.C. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatric Research**, **45**: 459-464, 1999.
- HOVIND, P., HANSEN, T. K., TARNOW, L., THIEL, S., STEFFENSEN, R., FLYVBJERG, A., PARVING, H. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes. **Diabetes**, **64**: 1523-1527, 2005.
- HOLMSKOV, U., MALHOTRA, R., SIM. R. B., JENSENIUS, J. C. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunology today**, **15**: 67-74, 1994.

- HUANG, Y. F., WANG, W., HAN, J. Y., WU, X. W., ZHANG, S. T., LIU, C. J. Increased frequency the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. **European Journal of Immunogenetics**, **30**: 121-124, 2003.
- IOBST, S. T., WORMALD, M. R., WEIS, W. I., DWEK, R. A., DRICKAMER, K. Binding of sugar ligando to Ca<sup>2+</sup> dependent animal lectins. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. **Journal of Biological Chemistry**, **69**: 15505-15511, 1994.
- IP, W. K., LAU, Y. L., CHAN, S. Y., MOK, C. C., CHAN, D., TONG, K. K., LAU, C. S., Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. **Arthritis and Rheumatism**, **43**: 1679-1687, 2000.
- JACK, D.L., READ, R. C., TENER, A. J., FROSCH, M., TURNER, M. W., KLEIN, N. J. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitides* serogroup B. **Journal of Infectious Diseases**, **184**: 1152-1162, 2001.
- JACK, D. L., LEE, M. E., TURNER, M. W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochemical Society Transactions**, **31**: 753-757, 2003.
- JANEWAY, C. A. J., TRAVERS, P., WALPORT, M., SCHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology**. Garland Science: New York, 178-181, 2005.
- KANG, B.K., SCHLESINGER, L.S. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. **Infection and Immunity**, **66**: 2769-77, 1998.

- KAUFMANN, S. H., MCMICHAEL, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. **Nature Medicine**, **11**: 33-44, 2005.
- KILPATRICK, D. C., BEVAN, B. H., LISTON, W. A. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. **Molecular Human Reproduction**, **10**: 2501-2505, 1995.
- KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, **12**: 335-351, 2002.
- KILPATRICK, D. C., DELAHOOKE, T. E. S., KOCH, C. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. **Clinical and Experimental Immunology**, **132**: 92-95, 2003.
- LAU, Y. L., LAU, C. S., CHAN, S. Y., KARLBERG, J., TURNER, M. W. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, **39**: 706-708, 1996.
- LHOTTA, K.; WURZNER, R.; KONING, P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, **14**, (4): 881-886, 1999.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., HILL, A.V., LAU, Y.L., LEVINSKY, R.J., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, **1**: 709-715, 1992.
- LIU, F., LIAO, Q., LIU, Z. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, **92**: 43-47, 2006.

- LOCHT, C., ROUANET, C., HOUGARDY, J. M, MASCART. F. How a different look at latency can help to develop novel diagnostics and vaccines against tuberculosis. **Expert Opinion on Biological Therapy**,7: 1-13, 2007.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., RYDER, L.P., THIEL, S., SVEJGAARD, A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, 40: 37–44, 1994.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J. A. L.,LAMM, L. U., RYDER, L. P., SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of Mannan-Binding Protein. **Journal of Immunology**, 139: 3013-3020, 1995.
- MADSEN, H. O., SATZ, M. L., HOGH, B., SVEJGAARD, A., GARRED, P. Different molecular events result in low protein levels of mannan binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **Journal of Immunology**, 161: 3169–3175, 1998.
- MALE, D. Migração celular e inflamação. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole,,: 47-64, 2003.
- MASS, J., HUSMAN, A. M. R., BROUWER, M., KROL, A., COUTINHO, R., KEET, I., LEEUWEN, R., SCHUITEMAKER, H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. **AIDS**, 12: 2275- 2280, 1998.

- MATSUSHITA, M., HIJIKATA, M., MATSUSHITA, M. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPB and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. **Journal Hepatology**, **29**: 695–700, 1998.
- MELO, F. A. F. Reações paradoxais no tratamento da tuberculose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35**, (1): 2002.
- MILLER, M. P. *Tools For Population genetic Analyses – TFPGA*, 1.3v, Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, UFA, 1997.
- MOMBO, L. E., LU, C. Y., OSSARI, S., BEDJABAGA, I., SICA, L., KRISHNAMOORTHY, R., LAPOUMEROLIE, C. Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections. **Genes and Immunity**, **4**: 362-367, 2003.
- OGDEN, C. A., CATHELINEAU, A., HOFFMANN, P. R., BRATTON, D., GHEBREHIWET, B., FADOK, V. A., HENSON, P. M. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake apoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, **194**: 781-795, 2001.
- PETERSEN, S. V., THIEL, S., JENSEN, L., VORUP-JENSEN, T., KOCH, C., JENSENIUS, J. C. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. **Molecular Immunology**, **37**: 803–811, 2000.
- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, **38**: 133-149, 2001.

- PINHEIRO, R. O., DALCOLMO, M. P., SAMPAIO, E. P. Tuberculose e TBMR: mecanismos imunológicos e novas ferramentas de controle da doença. **Revista de Comunicação Informação e Inovação em Saúde**, **2**: 132, 2008.
- PRESANIS, J. S., KOJIMA, M., SIM, R. B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). **Biochemical Society Transactions**, **31**: 748-752, 2003.
- PRODINGER, W. M. Complement. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2003. p. 1077- 1103.
- RECTOR, A., LEMEY, P., LAFFUT, W., KEYAERTS, E., STRUYF, F., WOLLANTS, E., VERMEIRE, S., RUTGEERTS, P., RANST, M. V. Mannan-binding lectin (MBL2) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Cohn's disease. **Genes and Immunology**, **2**: 323- 328, 2001.
- ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de Epidemiologia Sanitária**, **1**, (9): 35-57, 2001.
- ROSSI, V., CSEH, S., BALLY, I., THIELENS, N. M., JENSENIUS, J. C., ARLAUD, G. J. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin associated serine proteases-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, **276**: 40880-40887, 2001.
- RUFFINO, A. N. Tuberculosis: the neglected calamity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35**, (1): 51-58, 2002.
- RUGONFALVI-KISS, S. V., ENDRÉSZ, V., MADSEN, H. O., BURIÁN, K., DUBA, J., PROHÁSZKA, Z., KARÁDI, I., ROMICS, L., GÖNCZÖL, E., FÜST, G., GARRED, P. Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. **Circulation**, **106**: 1071-1076, 2002.

- SCHMIEGELOW, K. P., GARRED, P., LAUSEN, B., ANDREASSEN, B., PETERSEN, B. L., MADSEN, H. O. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, **100**: 3757-3760, 2002.
- SCHWAEBLE, W., DAHL, M., THIEL, S., STOVER, C., JENSENIUS, J. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP-1: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. **Immunobiology**, **205**: 455–466, 2002.
- SEIBOLD, F., KONRAD, A., FLOGERZI, B., SEIBOLD-SCHMID, B., ARNI, S., JULINGER, S., KUN, J. F. Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. **Gastroenterology**, **127**, (4): 1076-1084, 2004.
- SELVARAJ, P., JAWAHAR, M. S., RAJESWARI D. N., ALAGARASU K., MOHANKUMAR VIDYARANI, NARAYANAN, P. R.. Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis. **Immunology and Medical Microbiology**, **46**: 3, 433, 2006.
- SESPA. Secretaria Executiva do Estado de Saúde Pública/Departamento de Controle de Endemias, Belém-Pará, 2007.
- SHAFRASNKI, M. D., STIER, A., NISIHARA, R., MESSIAS-REASON, I. J. T. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role of MBL deficiency. **Clinical and Experimental Immunology**, **138**, (3): 521-525, 2004.

- SHAHEMABADI, A.S., HOSSEINI A. Z., SHAGHSEMPOUR, S., MASJEDI, M. R., RAYANI, M., POURAMIRI, M. Evaluation of T cell immune responses in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to *Mycobacterium tuberculosis* total lipid antigens. **Clinical Experimental Immunology**, **149**: 285-294, 2007.
- SILVA, M. T., R., PEDROSA, A. J., SOUSA, M. I. P., CASTRO, A. G., SILVA, M. NAZARÉ T., GOMES, S. Cooperação Macrófago-Neutrófilo nos Mecanismos de Defesa contra a infecção por Parasitas Intracelulares. **Revista da Sociedade Portuguesa de Imunologia**, **1**: 33-40, 1995.
- SOBORG, C., MADSEN, H. O., ANDERSEN, A. B., LILLEBAEK, T., KOK-JENSEN, A., GARRED, P. Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Clinical Tuberculosis **Journal of Infectious Diseases**, **188**: 777-782, 2003.
- SULIVAN, K. E., WOOTEN, C., GOLDMAN, D., PETRI, M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, Hagerstown, **39**: 2046-2051, 1996.
- SUMIYA, M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R. J., ARAI, T., TURNER, M. W., SUMMERFIELD, J. A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, **337**: 1569–1570, 1991.
- SUMMERFIELD, J. A., RYDER, S., SUMIYA, M. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. **Lancet**, **345**: 886–889, 1995.
- SUMMERFIELD, J. A., SUMIYA, M., LEVIN, M., TURNER, M. W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **British Medical Journal**, **314**: 1229–1232, 1997.

- SUPER, M., THIEL, S., LU, J. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonization. **The Lancet**, **2**, (8674): 1236 - 1239, 1989.
- STRONMEIEIR, G. R., FENTON, M. J. Roles of lipoarabimannan in the pathogenesis of tuberculosis. **Microbes and Infection**, p709-717, 1999.
- TEIXEIRA, H. C., ABRAMMO, C., MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **33**: 323-334, 2007.
- THIEL, S., HOLMSKOV, U., HVIID, L., LAURSEN, S. B., JENSENIUS, J. C. The concentration of C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during the acute phase response. **Clinical and Experimental Immunology**, **90**: 31-35, 1992.
- TIN, S. K., LEE, L. Y., THUMBOO, J., KOH, D. R., FONG, K. Y. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL-2) gene. **Journal of Immunological Methods**, **303**: 148-151, 2005.
- TORTOTA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**, 6<sup>a</sup> ed.Artemed Editora, 311, 2000.
- TSUTSUMI, A., SASAKI, K., WAKAMIYA, N., ICHIKAWA, K., ATSUMI, T., OHTANI, K., SUZUKI, Y., KOIKE, T., SUMIDA, T. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. **Genes and Immunology**, **2**: 99-104, 2001.
- TURNER, M. W. Deficiency of Mannan Binding Protein – A New Complement Deficiency Syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, **86**, (1): 53-56, 1991.

- TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, **17**, (11): 532-540, 1996.
- TURNER, M. W., HAMVAS, R. M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. **Reviews in Immunogenetics**, **2**: 305–322, 2000.
- TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, **40**: 423-429, 2003.
- VALLINOTO, A. C., MENEZES, M. R. C., ALVES, A. E., MACHADO L. F., AZEVEDO, V. N., SOUZA, L. L. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. **Molecular Immunology**; **43**: 1358-1362, 2006.
- VILLARREAL, J., CROSDALE, D., OLLIER, W., HAJEER, A., THOMSON, W., ORDI, J., BALADA, E., VILLARDELL, M., THE, L. S., POULTON, K. Mannose binding lectin and FC gamma RIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, **40**: 1009-1012, 2001.
- WALLIS, R., CHENG, J. Y. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. **Journal of Immunology**, **163**: 4953–4959, 2000.
- WANG, Z. Y., MORINOBU, A., KANAGAWA, S., KUMAGAI, S. Polymorphism of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **60**: 483-486, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global and regional incidence. Disponível em: <<http://www.who.org.int/topics/tuberculosis/en/>>. Acesso em 06/05/2007.

Imagem *M. tuberculosis*, coloração Ziehl Neelsen e colônias:

<<http://wikipedia.org/wiki/Tuberculose>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2007.